

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-369639

(43)Date of publication of application : 24.12.2002

(51)Int.Cl.

A01K 67/027
C12N 15/09

(21)Application number : 2001-155572

(71)Applicant : INST OF PHYSICAL & CHEMICAL RES

(22)Date of filing : 24.05.2001

(72)Inventor : HIRABAYASHI YOSHIO
OSUGA TAKESHI
TAKEDA JUNJI

(54) CONDITIONAL KNOCKOUT MAMMAL HAVING INACTIVATED SPHINGOLIPID SYNTHETIC ACTIVITY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a conditional knockout mammal having inactivated sphingolipid synthetic activity.

SOLUTION: The conditional knockout mammal is prepared by partially or totally inactivating the synthetic activity of sphingolipid in time-specific and/or tissue-specific state by modifying a part or total of the DNA region of serine palmitoyl transferase gene in the genom.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-369639
(P2002-369639A)

(43) 公開日 平成14年12月24日 (2002. 12. 24)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	データベース (参考)
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2001-155572(P2001-155572)

(22) 出願日 平成13年5月24日 (2001. 5. 24)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成12年11月25日
第23回日本分子生物学会年会組織委員会発行の「第23回
日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集」に発表

(71) 出願人 000006792

理化学研究所
埼玉県和光市広沢2番1号

(72) 発明者 平林 義雄

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(72) 発明者 大須賀 壮

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スフィンゴ脂質合成のコンディショナルノックアウト哺乳動物

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、スフィンゴ脂質合成のコンディショナルノックアウト哺乳動物を提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明のコンディショナルノックアウト哺乳動物は、ゲノム中のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のDNA領域の一部または全部を改変することにより、時期特異的及び／又は組織特異的にスフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化したことを特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】ゲノム中のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子の DNA 領域の一部または全部を改変することにより、時期特異的及び／又は組織特異的にスフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化した、非ヒトコンディショナルノックアウト哺乳動物。

【請求項 2】リコンビネースタンパク質／リコンビネース標的配列システムの利用により、リコンビネースタンパク質の発現に応じてゲノム中のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子の DNA 領域の一部または全部を改変することにより、時期特異的及び／又は組織特異的に、スフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化した、請求項 1 に記載のコンディショナルノックアウト哺乳動物。

【請求項 3】リコンビネースタンパク質が Cre タンパク質であり、リコンビネース標的配列が loxP である、請求項 1 に記載のコンディショナルノックアウトマウス哺乳動物。

【請求項 4】セリンパルミトイルトランスフェラーゼのサブユニットをコードする遺伝子 Lcb2 の一部または全部が改変されている、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載のコンディショナルノックアウト哺乳動物。

【請求項 5】セリンパルミトイルトランスフェラーゼのサブユニットをコードする遺伝子 Lcb2 のエクソン 3 の一部または全部が改変されている、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のコンディショナルノックアウト哺乳動物。

【請求項 6】表皮細胞特異的にスフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化した、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載のコンディショナルノックアウト哺乳動物。

【請求項 7】T 細胞特異的にスフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化した、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載のコンディショナルノックアウト哺乳動物。

【請求項 8】マウスである、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のコンディショナルノックアウト哺乳動物。

【請求項 9】時期特異的及び／又は組織特異的に、スフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化した、非ヒトコンディショナルノックアウト哺乳動物の作製方法であって、

1) セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノム DNA 領域の一部又は全部をリコンビネース標的配列で挟んだ配列を有し、前記配列でセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノム DNA 領域の一部又は全部を相同組換えすることを特徴とするターゲティングベクターを作製し；

2) 胚性幹細胞に前記ターゲティングベクターを形質導入し、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノム DNA 領域の一部又は全部の相同組換えを生じさせ、

3) 前記相同組換えを生じた胚性幹細胞を用いて、リコ

ンビネース標的配列を含む改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を有する遺伝子改変動物を作製し；そして

4) 前記遺伝子改変動物を、時期特異的及び／又は組織特異的にリコンビネースタンパク質を発現するリコンビネース発現遺伝子改変動物と交配して、セリンパルミトイルトランスフェラーゼタンパク質の発現が時期特異的及び／又は組織特異的に抑制される非ヒト哺乳動物を得ることを含む前記作製方法。

【請求項 10】リコンビネースタンパク質が Cre タンパク質であり、リコンビネース標的配列が loxP である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】ターゲティングベクターが、さらにターゲティングベクターが染色体に導入された胚性幹細胞のみを選別するための配列、及び／又は、非相同組換えを生じた胚性幹細胞を選択的に除くための配列を含む、請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】工程 3) が、ターゲティングベクターが導入された染色体に胚性幹細胞のみを選別するための配列を、染色体 DNA から削除する工程を含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】請求項 9 ないし 12 のいずれか 1 項の作製方法に使用するための、リコンビネース標的配列を含む改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を有する遺伝子改変動物。

【請求項 14】時期特異的及び／又は組織特異的に、スフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化した、非ヒトコンディショナルノックアウト哺乳動物の作製方法に使用するためのターゲティングベクターであって、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノム DNA 領域の一部又は全部をリコンビネース標的配列で挟んだ配列を含み、前記配列でセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノム DNA 領域の一部又は全部を相同組換えすることを特徴とする、前記ターゲティングベクター。

【請求項 15】さらにターゲティングベクターが染色体に導入された胚性幹細胞のみを選択するための配列、及び／又は、非相同組換えを生じた胚性幹細胞を除くための選択のための配列を含む、請求項 14 に記載のターゲティングベクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、スフィンゴ脂質合成のコンディショナルノックアウト哺乳動物およびその作製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】スフィンゴ脂質

スフィンゴ脂質は、スフィンゴリピドとも言われ、スフィンゴシンなど長鎖塩基をもつ脂質の総称であり、グリセロールを含む脂質、即ちグリセロ脂質と大別して用い

られる。主としてスフィンゴ糖脂質とスフィンゴリン脂質から成る、下等動物から高等動物に至るまで広く分布する脂質である。脂肪酸が、スフィンゴシン糖の長鎖塩基のC-2位のアミノ基と酸アミド結合しているのが特徴的である。グリセロ脂質と異なりリパーゼなどに対して極めて安定であり、また特にクロロホルム-メタノール混合溶液に可溶である。

【0003】スフィンゴ糖脂質は、スフィンゴ脂質のうち分子内に糖を含む一群(糖脂質)である。スフィンゴ糖脂質は糖と長鎖脂肪酸の他に長鎖塩基であるスフィンゴシンまたはフィツスフィンゴシン、その他を含む。比較的単純なスフィンゴ糖脂質は脳や腎臓などで見出されるセラブロシドである。さらにそれに硫酸基のついたスルファチド、中性糖が数分子ついたセラミドオリゴヘキシド、アミノ糖のついたグロボシド、シアル酸のついたガングリオシドの類も、スフィンゴ糖脂質の範疇に含まれる。

【0004】スフィンゴリン脂質は、スフィンゴ脂質の一群で、特に、リン(リン酸、ホスホン酸等)を含有するものを総称する。主にセラミド1-リン酸の誘導体とセラミド1-ホスホン酸の誘導体に分けられる。例えば、前者にはスフィンゴミエリン、後者にはセラミドシリアチン(セラミドアミノエチルホスホン酸)が含まれる。狭義には、前者のみをスフィンゴリン脂質とし、後者をスフィンゴホスホノ脂質として区別する場合もある。

【0005】スフィンゴ脂質の生合成

スフィンゴ脂質の生合成経路は、よく研究されている(図1)。まず、セリンとパルミトイルCoAを出発物質とし、4段階の工程を経てセラミド(N-アシルスフィンゴシン)が合成される。次いで、セラミドに、先ずグルコシルトランスフェラーゼ(GlcT-1)によりUDPグルコースからグルコースが転移されることで、グルコシルセラミドが合成される。グルコシルセラミドを出発物質としてスフィンゴ糖脂質の生合成が始まり、ガラクトシルトランスフェラーゼ(Gal-T)に代表される種々の糖転移酵素の働きを順次受けて、ガングリオ系列(Gangliosides)、グロボ系列(Globosides)、ラクト系列(Lactosides)等のスフィンゴ糖脂質が得られる。また、セラミドに初めにグルコースの代わりに、UDPガラクトース:セラミドガラクトシルトランスフェラーゼ(GCT)によってガラクトースが転移された場合には、ガラクトシルセラミドが得られる。一方、スフィンゴリン脂質も、セラミドを出発物質として、例えば、その第一級アルコール性ヒドロキシル基にコリンリン酸(例えば、ホスファチジルコリン由来)がスフィンゴミエリン合成酵素によってリン酸ジエステル結合することにより、スフィンゴミエリンが得られる。

【0006】スフィンゴ脂質の機能

スフィンゴ脂質の現在知られている機能としては、主に1)細胞膜構成成分としての機能、そして2)シグナル伝達物質としての機能が含まれる。

【0007】1)細胞膜構成成分としての機能スフィンゴ脂質は、細胞膜構成成分、特に情報伝達場を提供するための細胞膜構成成分としての機能を有する。

【0008】細胞は細胞膜によって外界から隔離されたユニットと捉えることができる。細胞膜は細胞ごとに変動はあるものの、おおむね約50%の脂質と約50%のタンパク質から構成されている。細胞膜を構成する脂質には、リン脂質、糖脂質、ステロールがある、リン脂質としては、フォスファチジルコリン等のグリセロール骨格を有するフォスフォグリセリドの他に、本発明に関するスフィンゴ脂質が含まれる。また、糖脂質としてもスフィンゴシンを骨格としてグルコース、ガラクトースなどの糖を含む、若しくはシアル酸による修飾を受けている、スフィンゴ糖脂質が含まれる。リン脂質、糖脂質、ステロール等の脂質は、非極性基を互いにつきあわせて極性基を外に向けた二重膜構造を形成している。

【0009】細胞膜の脂質構成は一定でなく、不均一性が存在していることが知られている。例えば、上皮細胞の頂端部と側底部側の細胞膜の脂質構成には違いがあり、糖脂質は頂端部に多く分布している。特に近年、より局所的に脂質構成を有する細胞膜のドメインの存在が知られるようになった。そのような局在性ドメインの代表例としてカベオラとラフトがある。

【0010】「カベオラ」は、上皮細胞など種々の細胞の細胞膜直下に存在する細胞内構築物である。50-100nm程度のフラスコ状、または細胞膜に開口した陥入状構造をとる。分泌顆粒や食食顆粒と異なり常に細胞膜下にとどまって存在し、細胞膜上のマイクロドメインの形成にも重要と考えられている。生化学的には界面活性剤であるトリトンX-100の不溶画分として精製され、細胞膜と異なる特徴的な物質組成を有し、脂質ではスフィンゴミエリンに、タンパク質(カベオリン)はグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI: glycosyl phosphatidyl inositol)アンカー型タンパク質に富む。カベオラの機能としては、葉酸トランスポーターやcAMP結合タンパク質等の低分子の取り込み(ボトサイトーシス)、細胞表面でのシグナル変換・伝達、細胞内コントロール輸送等への関与が示唆されている。

【0011】「ラフト」は、スフィンゴ脂質とコレステロールに富み、タンパク質の選別に関与する膜ドメインとして提唱された。スフィンゴ脂質は脂肪酸部分(アシル鎖)が飽和型であることが多く、脂質二重層の中で固くパックしていると考えられる。一方、リン脂質はシス型の不飽和アシル鎖をもっており、この部分がねじれているためにリン脂質同士はバックしにくい状態になっていて、流動性の高い相を形成している。その上、コレス

テロールのステロイド環は飽和アシル鎖と相互作用しやすいため、コレステロールは不飽和アシル鎖をもつリン脂質よりも飽和アシル鎖をもつスフィンゴ脂質により結合しやすい。スフィンゴ脂質は互いの糖鎖間、スフィンゴシン骨格間でファンデルワールス力および水素結合力によって結合している。スフィンゴ脂質間の間隙は飽和脂肪酸によって非共有結合で相互作用するコレステロールによって埋められている。即ち、リン脂質が多い環境下でスフィンゴ脂質とコレステロールは固くパックされたマイクロドメインを形成すると考えられている。

【0012】ラフトはその構造から、非イオン性の界面活性剤に溶けにくく、比重が軽いという性質を示す。そのため、細胞を界面活性剤で可溶化後、ショ糖密度勾配法を用いて遠心すると、ラフトは低比重の画分に浮上し、他の可溶性の細胞膜構成成分からこのドメインを分離することができる。これまでショ糖密度勾配法での分離により、ラフトの脂質およびそこに存在するタンパク質の解析がなされている。GPIアンカー型タンパク質をはじめ、膜に存在する細胞質タンパク質であるSrc型チロシンキナーゼなど、特徴ある分子が局在することが示されている。このラフトの性質から細胞膜上のマイクロドメインに特定の分子群を集めてその他の分子を除外する働きを有することが示唆されている。即ち、ラフトにはシグナル伝達物質などの様々な蛋白質が局在していて、細胞内の物質の移動や情報伝達の場として機能している、と考えられている。

【0013】カベオラとラフトは、その脂質組成や可溶化剤に不溶性の性質を示すなど、性質の似た構造を示す。また、密度勾配遠心法を利用した精製においても、カベオラとラフトは類似の挙動を示すため、両者が完全に分離しているとは考えにくい。よって、両者が示すと考えられている機能の関係については、充分には解明されていない段階である。但し、リンパ球については、カベオラの構造維持に必須のカベオリントタンパク質を有せず、カベオラは認められない。一方、ラフトはリンパ球にも認められる。よって、ラフトはカベオラ内にもカベオラ外の細胞膜にも存在するものと考えられている。

【0014】「カベオラとラフト」藤本ら、細胞工学 Vol. 18, No. 8, 1999, p. 1155-1161; 「T細胞抗原受容体シグナル伝達におけるラフトの役割」安田ら、蛋白質 核酸 酵素 Vol. 45, No. 11 (2000), p. 1812-1822。

【0015】2) シグナル伝達物質としての機能
スフィンゴ脂質の代謝産物(セラミド及びスフィンゴシン1-リン酸)は、生存、細胞死や分化等における細胞間あるいは細胞シグナル分子として大変注目されている。

【0016】具体的には、セラミドは様々なストレス又は薬剤(例えば、抗癌剤)によるアポトーシスにおける

脂質メディエーターとして重要な役割を果たしている。スフィンゴシン1-リン酸は、血管内皮細胞表面上にその特異的レセプター(血管内皮細胞分化遺伝子(endothelial differentiation gene)(Edgファミリー))が発現しており、血管形成等で重要な働きをすることがわかっている。

【0017】スフィンゴ脂質合成機能のノックアウト
上述したように、スフィンゴ脂質は細胞膜構成成分として、又は、シグナル伝達物質として重要な生体機能を担っていると考えられている。しかしながら、実際の個体レベルでの機能に関してはほとんど調べられていない。

【0018】Hanadaら(Journal of Biological Chemistry, Vol. 267, 1992, p. 23527-23533)はCHO細胞由来の温度感受性変異株SPB-1を用いて、細胞内でのスフィンゴ脂質全体の合成の役割を記載している。具体的は、本明細書の図1において、スフィンゴ脂質合成の一番最初の工程として、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ酵素(SPT)によって、パルミトイルCoAと非必須アミノ酸L-セリンが縮重合し、3-ケトスフィンガニンが合成される。SPTは、Lcb1とLcb2の2種のサブユニットからなるヘテロダイマーである。Hanadaらは、これらのうちサブユニットLcb1サブユニットが、非許容温度になると機能しなくなるような変異株を樹立した。Lcb1変異遺伝子を有する温度変異株SPB-1は、非許容温度下におくと細胞死が引き起こされた。

【0019】個体レベルでのスフィンゴ脂質の機能を解析するためには、スフィンゴ脂質の合成を支配している酵素の遺伝子を人為的に破壊した、いわゆるノックアウト動物を作成することが考えられる。しかしながら、上記Hanadaらの論文からも示唆されるように、スフィンゴ脂質は細胞の生存に必須な膜構成成分であることから、スフィンゴ脂質全体の合成を支配している酵素のSPT遺伝子(Lcb1又は2)を不活化したノックアウト動物は胎生致死であると予想される。その為、スフィンゴ脂質合成を時期特異的にあるいは組織特異的に(コンディショナルに)制御可能なノックアウト動物の作成が必要となる。

【0020】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、スフィンゴ脂質合成のコンディショナルノックアウト哺乳動物を提供することを目的とする。本発明のコンディショナルノックアウト哺乳動物は、ゲノム中のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のDNA領域の一部または全部を改変することにより、時期特異的及び/又は組織特異的にスフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化したことを特徴とする。

【0021】本発明のコンディショナルノックアウト哺乳動物は、好ましくは、リコンビネースタンパク質/リ

10

20

30

40

50

コンビネース標的配列システムの利用により、リコンビネースタンパク質の発現に応じてゲノム中のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のDNA領域の一部または全部を改変することによって作製される。

【0022】本発明のコンディショナルノックアウト哺乳動物は、好ましくはマウスである。本発明はまた、時期特異的及び／又は組織特異的に、スフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化した、非ヒトコンディショナルノックアウト哺乳動物の作製方法を提供することを目的とする。本発明の作製方法は、

1) セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部をリコンビネース標的配列で挟んだ配列を有し、前記配列でセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部を相同組換えすることを特徴とするターゲティングベクターを作製し；

2) 胚性幹細胞に前記ターゲティングベクターを形質導入し、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部の相同組換えを生じさせ、

3) 前記相同組換えを生じた胚性幹細胞を用いて、リコンビネース標的配列を含む改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を有する遺伝子改変動物を作製し；そして

4) 前記遺伝子改変動物を、時期特異的及び／又は組織特異的にリコンビネースタンパク質を発現するリコンビネース発現遺伝子改変動物と交配して、セリンパルミトイルトランスフェラーゼタンパク質の発現が時期特異的及び／又は組織特異的に抑制された非ヒト哺乳動物を得ることを含むことを特徴とする。

【0023】本発明はさらに、前記コンディショナルノックアウト哺乳動物の作製方法に使用するための、リコンビネース標的配列を含む改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を有する遺伝子改変動物を提供することを目的とする。

【0024】本発明はさらにまた、前記非ヒトコンディショナルノックアウト哺乳動物の作製方法に使用するためのターゲティングベクターを提供することを目的とする。本発明のターゲティングベクターは、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部をリコンビネース標的配列で挟んだ配列を含み、前記配列でセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部を相同組換えすることを特徴とする。

【0025】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記問題を解決するために鋭意研究に努めた結果、スフィンゴ脂質の生合成を組織特異的もしくは時期特異的に停止させるノックアウトマウスを作製することに成功し、本発明を相当した。

【0026】スフィンゴ脂質合成のコンディショナルノックアウト哺乳動物

本発明は、スフィンゴ脂質合成のコンディショナルノックアウト哺乳動物を提供する。本発明のコンディショナルノックアウト哺乳動物は、ゲノム中のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のDNA領域の一部または全部を改変することにより、時期特異的及び／又は組織特異的にスフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化していることを特徴とする。

【0027】本明細書において、「セリンパルミトイルトランスフェラーゼ」は、スフィンゴ脂質合成の一番最初の工程において、パルミトイルCoAと非必須アミノ酸L-セリンとを縮重合し、3-ケトスフィンガニン合成する酵素である。セリンパルミトイルトランスフェラーゼは、SPTは、Lcb1とLcb2の2種のサブユニットからなるヘテロダイマーである。Lcb1については、例えば、Hanada, K et al., Journal of Biological Chemistry, Vol. 272 (51), 1997, p. 32108-32114にマウスLcb1のcDNA配列がGene bank accession No. AF003823として寄託されたことが記載されており、推定アミノ酸配列が開示されている。Lcb2は、例えば、Nagiec, M. M. et al., Gene 1996, Oct 24; 177 (1-2): 237-41には、マウスLcb2のcDNA配列がGene bank accession No. U27455として寄託されたことが記載されており、推定アミノ酸配列が開示されている。本明細書において後述する配列表中において、Lcb2のアミノ酸配列を配列番号1、cDNAの塩基配列を配列番号2として各々記載する。また、前述のNagiec, M. M. et al., Gene 1996は、ヒトLcb2とマウスLcb2のアミノ酸配列を、K. lactis, S. cerevisiae, S. pombe等の酵母由来のLcb2と併せて比較している。スフィンゴ脂質は下等動物から高等動物に至るまで広く分布する脂質であり、SPTのサブユニットLcb2も酵母からヒトまで存在し、高い相同性を示す。

【0028】Lcb2は、SPTの酵素活性を担っている、即ち活性部位を含むサブユニットであり、そして、Lcb1は、活性を制御するサブユニットであると考えられている。よって、本発明においてSPTを不活化するためには、Lcb2をコードする遺伝子の一部または全部に変異を施すのが好ましいが、これに限定されない。前述のHanadaらの論文(1992)では、Lcb1サブユニットをコードする遺伝子に変異を施した温度変異株で細胞死が引き起こされたことから、Lcb1に変異を施してSPTを不活化させることも可能である。

【0029】セリンパルミトイルトランスフェラーゼが実質的に不活化されれば、本発明において改変されるのは、ゲノム中のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のDNA領域の全部であっても一部であってもよい。変異が導入される部分がL c b 1 遺伝子またはL c b 2 遺伝子の3' 側であって、L c b 1 遺伝子またはL c b 2 遺伝子の5' 側部分は正常に転写、翻訳される場合、L c b 1 またはL c b 2 のN末端側は機能可能のように発現する、即ち、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ活性が一部残存する可能性がある。よって、限定されるわけではないが、変異が導入される部分は、L c b 1 遺伝子またはL c b 2 遺伝子の5' 側が好ましい。

【0030】一方、開始コドンを含む5' 側上流の部分、即ち、ゲノム中の転写または翻訳を制御するための核酸配列を含む部位、例えば、転写プロモーター、オペレーター、又はエンハンサー、mRNAリボソーム結合部位、及び、その他、転写および翻訳の開始を調節する部位を含む領域に変異を施すと、L c b 1 またはL c b 2 遺伝子がコンデシショナルにではなく完全に不活化して全く発現しなくなる場合がありうる。これは、一定条件下、即ち、時期特異的及び／又は組織特異的にのみスフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化した、コンデシショナルノックアウトされた非ヒト哺乳動物を得るという本発明の目的を達成できなくなる。よって、限定されるわけではないが、このような領域に変異を導入するのは好ましくない。

【0031】以上より、非限定的に、L c b 1 遺伝子またはL c b 2 遺伝子のゲノム中、開始部位より下流において、好ましくは半分より5' 上流側、より好ましくは1/3より上流側に変異を施す。例えば、L c b 2 ゲノムはエクソン1からエクソン12からなると推定されているが、好ましくはエクソン1-エクソン6の範囲内において、より好ましくはエクソン3-エクソン5の範囲内において変異を導入する。本明細書において後述する実施例においてはマウスL c b 2 ゲノムのエクソン3を改変するように変異を導入することによって、時期特異的及び／又は組織特異的にのみスフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化した、コンデシショナルノックアウトマウスを得ることに成功した。

【0032】また、本明細書においては、スフィンゴ脂質合成の一番最初の工程において、パルミトイルCoAと非必須アミノ酸L-セリンとを縮重合し、3-ケトスフィンガニン合成する酵素、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ酵素に変異を施してスフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化させた。3-ケトスフィンガニンより続いてセラミドが合成されるまでの経路は、全てのスフィンゴ脂質合成に共通する経路である(図1)。よって、図1において、3-ケトスフィンガニンよりスフィンガニンが合成される工程、スフィンガニンからN-アシルスフィンガニンが合成される工程そしてN-ア

シルスフィンガニンからセラミド合成する工程の、各工程に關与する各酵素をコードする遺伝子を改変することによっても、同様にスフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化させることが可能である。

【0033】本発明において、「ゲノム中のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のDNA領域の一部または全部を改変する」とは、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNAの一部に変更、削除、置換を生じさせること、あるいは特定の範囲の領域の逆位をさせること等を言う。セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を機能不能にするためには、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子に対して、変更、削除、挿入または置換のうち2またはそれ以上の方法を同時に使用してもよい。また、改変を生じさせるセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子は、1つの遺伝子のみに限られず、2以上の遺伝子、例えばL c b 1 及びL c b 2 遺伝子の双方について同時に改変を生じさせてもよい。

【0034】本発明において、ゲノムDNAの「変更」とは、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA配列中に1またはそれ以上の塩基置換を導入し、当該変更したセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子の発現産物がセリンパルミトイルトランスフェラーゼとして機能しないようにすることをいう。本発明においてゲノムDNAの「削除」とは、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムの一部または全部を欠失させることにより、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子の発現産物がセリンパルミトイルトランスフェラーゼとして機能しないかまたは存在しないようにすることをいう。本発明において、ゲノムDNAに対して「挿入」とは、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子中に、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子以外の配列を有するDNAを挿入することにより、当該セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子以外のDNAを挿入したセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子の発現産物がセリンパルミトイルトランスフェラーゼとして機能しないようにすることをいう。本発明において、ゲノムDNAの「置換」とは、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムの一部または全部をセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子とは関連しない別個の配列により置換し、セリンパルミトイルトランスフェラーゼの発現産物がセリンパルミトイルトランスフェラーゼとして機能しないかまたは存在しないようにすることをいう。

【0035】本発明のノックアウトマウスは、特に、時期特異的及び／又は組織特異的に、即ち、コンデシショナルにスフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化させていることを特徴とする。時期特異的及び／又は組織特異的に遺伝子の発現を制御する一般的な方法として、例えば、A) リコンビネースタンパク質/リコンビネー

ス標的配列システムを利用した遺伝子組換え誘導型の方法、B) テトラサイクリンアクティベーターなどを用いた遺伝子発現制御型の方法、並びにA) 及びB) を組み合わせた方法などが知られている(例えば、別冊 実験医学 ザ・プロトコールシリーズ 「ジーンターゲティングの最新技術」(2000年、羊土社) コンディショナルターゲティング法 p. 115-120; バイオマニュアルシリーズ8 「ジーンターゲティング」-ES細胞を用いた変異マウスの作製(1995年、羊土社) p. 71-77); Sambrookら, Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL, 第3版, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, 2001年, 4. 82-4. 85)。

【0036】A) のリコンビネースタンパク質/リコンビネース標的配列システムを利用した、遺伝子組換え誘導型の方法は、特定のリコンビネースタンパク質がリコンビネース標的配列を認識し、その部分でDNAの組換えを起こすことを利用するものである。リコンビネース標的配列は特定のリコンビネースが存在しない限り組換えを起こさない。よって、リコンビネースタンパク質を時期特異的及び/又は組織特異的発現させた非ヒト遺伝子改変哺乳動物と、リコンビネース標的配列が導入された同種の非ヒト遺伝子改変哺乳動物とを掛け合わせ、リコンビネースによる組換えを時期特異的及び/又は組織特異的に生じさせ、所期の遺伝子を時期特異的及び/又は組織特異的に制御することを可能にする。限定されるわけではないが、バクテリオファージP1由来のCreリコンビネースタンパク質とCreタンパク質によって認識される34塩基対のloxP配列を利用したCre/loxPシステムが好ましい。その他、酵母由来のFLP/FRTシステム(Jung, S. et al., Science, 265, p. 1031, 1994)

(哺乳動物細胞、ショウジョウバエ(Drosophila)でも相同組換えを生じる)、Zygosaccharomyces rouxiiのpSR1リコンビネース(酵母S. cerevisiaeで機能しうる)等も知られている。リコンビネースタンパク質/リコンビネース標的配列システムを利用したコンデショナルノックアウトされた非ヒト哺乳動物の作製方法については、作製方法の項でさらに詳述する。

【0037】B) の遺伝子発現制御型の方法は、特定遺伝子欠損哺乳動物に、欠損させた遺伝子を改変遺伝子の導入によりレスキューさせる方法を利用する。遺伝子発現系をレスキューする際、テトラサイクリンアクティベーター(TET-A)等のトランスアクティベーター制御下で、欠損させた遺伝子そのものを発現させる。その際、TET-A遺伝子は、欠損遺伝子と同じ発現様式をもつことが必要となるので、ジーンターゲティングの際ノックインにより、TET-A遺伝子を導入する。この

ノックインされたTET-A遺伝子は遺伝子欠損させられた遺伝子の発現系を利用して発現したTET-Aが、トランスジェニックで導入したtetプロモーターに働き、欠損遺伝子を発現する。即ち、特定遺伝子発現をTET-Aとtetプロモーターを介して行わせるマウスを作製する。TET-Aは外部よりテトラサイクリンを添加することにより、tetプロモーターに作用できなくなり、よってテトラサイクリンの添加する組織および時期で特定遺伝子を欠損させることができるというものである。この方法は、テトラサイクリンの人為的な導入を工夫することにより、遺伝子欠損を調節でき、またテトラサイクリンの添加を止めることにより遺伝子発現を回復させることができるため、パルスとして遺伝子欠損を行わせるなどの系が可能となる。

【0038】本発明は、特に、表皮細胞特異的にスフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化したコンデショナルノックアウト哺乳動物、及びT細胞特異的にスフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化したコンデショナルノックアウト哺乳動物を含む。これらは、例えば、リコンビネースタンパク質/リコンビネース標的配列システムを利用し、表皮細胞特異的に、又はT細胞特異的にリコンビネースを発現する遺伝子改変動物を利用することにより得ることが可能である。

【0039】本発明のコンデショナルノックアウト哺乳動物は、非ヒトの哺乳動物であり、好ましくはマウス、ラット、ヤギ、ウシ、ブタ、ウサギ、ヒツジ等である。取扱いが容易で、実験系が確立しているマウスが最も好ましい。また、本発明のノックアウト哺乳動物は成体のみならず、ES細胞、受精卵、8細胞期から胚盤胞形成そして出生直前までの胚、卵、精子、組織・器官培養物、キメラ動物等の全ての態様を含む。これらは、保存のため、必要に応じ冷凍されて状態であってもよい。

【0040】非ヒト コンデショナルノックアウト哺乳動物の作製方法

本発明はさらに、時期特異的及び/又は組織特異的に、スフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化した、非ヒト コンデショナルノックアウト哺乳動物の作製方法を提供する。本発明の作製方法は、

1) セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部をリコンビネース標的配列で挟んだ配列を有し、前記配列でセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部を相同組換えすることの特徴とするターゲティングベクターを作製し;

2) 胚性幹細胞に前記ターゲティングベクターを形質導入し、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部の相同組換えを生じさせ、

3) 前記相同組換えを生じた胚性幹細胞を用いて、リコンビネース標的配列を含む改変セリンパルミトイルトラ

ンスフェラーゼ遺伝子を有する遺伝子改変動物を作製し；そして

4) 前記遺伝子改変動物を、時期特異的及び／又は組織特異的にリコンビネースタンパク質を発現するリコンビネース発現遺伝子改変動物と交配して、セリンパルミトイルトランスフェラーゼタンパク質の発現が時期特異的及び／又は組織特異的に抑制される非ヒト哺乳動物を得ることを含むことを特徴とする。

【0041】上述した本発明の非ヒト コンデショナルノックアウト哺乳動物は、限定されるわけではないが、好ましくは、リコンビネースタンパク質／リコンビネース標的配列システムを利用した本発明の作製方法によって作製される。限定されるわけではないが、本発明の説明のために、本発明のリコンビネースタンパク質／リコンビネース標的配列システムを利用したコンデショナルノックアウトの例の概念図を図2に示す。

【0042】1. セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA

ゲノムDNAは、胚性幹細胞（ES細胞）の相同組換えを行うための、ターゲティングベクターを構築するため10に使用する。従って、ゲノムDNAは、相同組換えを行うときにより効率よく組換えが生じるよう、作製しようとするES細胞が由来する動物種と同一の動物種から単離、使用することが望ましい。より望ましくは、相同組換えの効率をさらに上げるために、ES細胞が由来する同一種の動物のうち同じ系統の動物から、ゲノムDNAを単離して使用する。同種であっても系統が異なるとゲノム中にDNAの配列変異が散在し、それらの変異が相同組換えの確率を下げる可能性があるからである。

【0043】例えば、マウス セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子（Lcb1又はLcb2）のゲノムクローンを採取する場合には、マウス由来のcDNAプローブまたはゲノムDNAプローブを使用して、マウスゲノムライブラリーからスクリーニングすることができる。cDNAプローブを使用する場合は、目的とするセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子について15のcDNAの全長を使用しても、その一部を使用してもよい。あるいは、既知のマウス セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子の配列に基づいて作製した合成オリゴヌクレオチドをプローブとしてもよい。

【0044】具体的には、Lcb1については、例えば、Hanada, K et al., Journal of Biological Chemistry, Vol. 272 (51), 1997, p. 32108-32114にマウスLcb1のcDNA配列がGene bank accession No. AF003823として寄託されたことが記載されており、推定アミノ酸配列が開示されている。Lcb2は、例えば、Gene bank accession No. U27455としてマウスLcb2のアミノ酸配列およ20

びcDNAの塩基配列が開示されている。本明細書において後述する配列表中において、マウスLcb2のアミノ酸配列を配列番号1、cDNAの塩基配列を配列番号2として各々記載する。また、Nagiec, M. M. et al., Gene 1996 Oct 24; 177 (1-2): 237-41は、ヒトLcb2とマウスLcb2のアミノ酸配列を、K. lactis, S. cerevisiae, S. pombe等の酵母由来のLcb2と併せて比較している。これらの配列に基づいてcDNAの全長若しくは一部を利用したcDNAプローブ、または合成オリゴヌクレオチドプローブを作製し、ゲノムライブラリーをスクリーニングすることができる。

【0045】プローブ結合性を示したセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子ゲノムDNA断片を制限酵素で切り出し、市販のクローニング用ベクター中に挿入する。クローニング用ベクターとしては、市販されているpBluescript (Stratagene社)、pBR322、pUCなどのいずれのプラスミドを用いてもよい。このようにして単離されたゲノムクローンを部分配列決定することにより、単離されたゲノムクローンが目的とするセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子についてのゲノムクローンであることを確認することができる。

【0046】2. ターゲティングベクターの構築

ターゲティングベクターは、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部をリコンビネース標的配列で挟んだ配列を有し、前記配列でセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部を相同組換えするために使用するものである。従って、本発明におけるセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のターゲティングベクターは、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部をリコンビネース標的配列で挟んだ配列を含むことを特徴とする。リコンビネース標的配列で挟まれた配列が相同組換えによりゲノム中に挿入された場合、標的配列を認識する対応するリコンビネースタンパク質の酵素活性により、リコンビネース標的配列で挟まれた配列がゲノムから削除、逆位等の改変を受ける。リコンビネース活性が存在しない場合には配列の削除等は生ぜず、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNAの転写、翻訳はリコンビネース標的配列の存在にかかわらず野生型と同様に行われ、機能的なセリンパルミトイルトランスフェラーゼタンパク質が得られ、スフィンゴ脂質合成が正常に行われる。よって、リコンビネースタンパク質の発現を時期特異的及び／又は組織特異的に制御することによって、スフィンゴ脂質合成の一部又は全部を時期特異的及び／又は組織特異的に不活化させることが可能になる。50

【0047】本発明によって利用しうるリコンビネースタンパク質／リコンビネース標的配列システムは、バクテリオファージP1由来のCreリコンビネースタンパク質とCreタンパク質によって認識される、P1中の組換えのホットスポットloxP配列を利用したCre-loxPシステム、酵母由来のFLP／FRTシステム(Jung, S. et al., Science, 265, p. 1031, 1994)(哺乳動物細胞、ショウジョウバエ(Drosophila)でも相同組換えを生じる)、Zygosaccharomyces r

5' -ataacttcgtata atgt | atgc tataggaagtat-3'
3' -tattgaagcatat taca | tagc atatgcttcaata-5'
逆方向反復配列 スペーサー 逆方向反復配列

(配列番号3)

loxP部位における組換えは、P1のcre遺伝子によってコードされる343アミノ酸リコンビネースタンパク質であるCreによって触媒される。各loxP部位は、13塩基対の繰り返しと隣接する4塩基対のスペーサーからなる、2つのCre結合部位からなる。各繰り返し配列のもっとも遠位の2塩基対は、組換え頻度を変化させることなく修飾可能である。各loxP部位に1個づつ合計2個のCre分子が結合する。次いで、Cre-loxP複合体は、同一の核酸分子(DNA等)上に存在する第2のloxP部位と対合する。スペーサー領域中のDNAの非対称的な切断に続いて、対合したloxPパートナー間の鎖交換が誘導される。スペーサー領域の非対称性のため、同一の核酸分子上に位置するloxP間の組換えは極性を有する。即ち、同一方向のloxP間の組換えは、2カ所の部位間のDNAの切り出し(削除)を生じさせ、反対方向のloxP間の組換えは、2カ所の部位間の介在DNAの逆位をもたらす。

【0050】Creタンパク質は細菌(大腸菌等)中だけでなく、酵母及び哺乳動物細胞中에서도組換え現象を触媒する。よって、Creリコンビネースタンパク質は、酵母及び哺乳動物細胞中において、染色体にプラスミドの部位特異的挿入を引き起こすことも、また、複数(好ましくは2カ所)のloxP部位に挟まれたDNA領域の削除を引き起こすことも可能である。酵母及び哺乳動物細胞中のゲノムはloxP部位を有しないと考えられている。さらに、Creタンパク質の発現は、特に高発現させなければ哺乳動物細胞に毒性でなく、また、例えばマウスのメタロチオネインIプロモーター若しくはサイトメガロウイルスプロモーター等のプロモーター等の制御下にcre遺伝子を有する遺伝子改変マウスは、発生、成長、生殖の各過程において影響を受けない。

【0051】Creタンパク質によって認識される配列は上述した配列番号3に限定されず、塩基配列に若干の変異があってもCreタンパク質によって認識され、同様に組み換えを生じうる。例えば、限定されるわけではないが、各繰り返し配列のもっとも遠位の2塩基対は、

ouxiiのpSR1リコンビネース(酵母S. cerevisiaeで機能しうる)等が含まれる。

【0048】限定されるわけではないが、Cre/loxPシステムが好ましい。loxPは、以下の34塩基対を有し、8塩基対のスペーサーによって隔てられた13bpの逆方向反復配列(inverted repeat sequence)からなる。

【0049】

【化1】

組換え頻度を変化させることなく修飾可能である。また、スペーサー配列5'-atgtatgc-3'中の一番5'側のt塩基をgに変異させると、形質転換された哺乳動物細胞中の組換え頻度が実質的に上昇するという報告もある。よって、本明細書において、このような変異を含むCreタンパク質によって認識される配列も、本発明において利用しうる「loxP」配列を含む。

【0052】複数(好ましくは2カ所)のloxP部位に挟まれたDNA領域の削除は、染色体上のloxP部位へのloxPプラスミドの部位特異的挿入よりも高頻度で生じうる。染色体の特定の位置にloxP部位を含む、遺伝子工学的に得られた哺乳動物(例えば、マウス)の系を、Creを発現する遺伝子改変動物を交配することにより、Cre-loxPシステムを利用して、所期の遺伝子のヌルアリル(ヌル対立遺伝子群)を作成させることが可能である。よって、好ましくは、本発明のターゲティングベクターは、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部を、同一方向の複数(好ましくは、2個)のloxP配列で挟む。相同組換えによって前記配列がゲノムに組み込まれるとCreタンパク質の存在により、複数のloxP配列で挟まれたセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部が削除(切り出し)される。また、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を反対方向の複数のloxP配列に含んだ場合、特定の染色体部位の逆位および削除等を生じうる。よって、このような態様も、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部に改変を生じうるため本発明に含みうる(Sambrookら, Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL, 第3版, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, 2001年, 4.82-4.85)。

【0053】限定されるわけではないが、一般に、ター

ゲティングベクターによってゲノムDNAの相同組換えが効率よく起こるためには、相同領域が長いほどよい。一方、ターゲティングベクターの種類によって、挿入し取り扱える好ましいDNAの長さは一定に制限される。よって、前述したように得られたセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子ゲノムDNA中の、好ましくは1 kb-20 kb、より好ましくは5 kb-20 kb、最も好ましくは10 kb-20 kbをターゲティングベクターに含ませる。そのうち、適用するリコンビネースタンパク質/リコンビネース標的配列システムによって、削除(切り出し)等の改変が生じやすい長さの配列を、2個以上のリコンビネース標的配列によって挟むように設計する。限定されるわけではないが、Cre-loxPシステムを適用する場合、好ましくは1 kb-100 kb、より好ましくは1 kb-10 kb、最も好ましくは1.2 kb-3.5 kbの長さの配列を2個以上のloxP配列によって挟む。本明細書において後述する実施例のターゲティングベクターでは、マウスLcb2ゲノムのエクソン3を挟むゲノム配列(長さ約1.2 kb)を2個のloxPで挟む構造とした。

【0054】リコンビネース標的配列を組み込んだ改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子が導入される、本発明のターゲティングベクターの基本骨格となるベクターは特に限定されず、形質転換を行う細胞(例えば、大腸菌)中で自己複製可能なものであればよい。例えば、市販のpBluscript(Stratagene社製)、pZErO 1.1(Invitrogen社)、pGEM-1(Promega社)等が使用可能である。

【0055】本発明の方法は、リコンビネース標的配列を組み込んだ改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を含むターゲティングベクターで、胚性幹細胞(ES細胞)を形質転換し、相同組換えを生じさせる。ターゲティングベクターの構築についてデザインする場合、後の工程において行わなければならない相同組換え体のスクリーニングを、より容易に行うことができるように考慮することが望ましい。例えば、相同組換え体のスクリーニングは、(1)ターゲティングベクターにより組換え体内に導入したポジティブ選別、ネガティブ選別等の選別用の遺伝子を用いて、培養中を行う細胞レベルの第一段階のスクリーニング、そして(2)第一段階のスクリーニングにより選択された組換え体について、さらにPCR法、サザンブロットハイブリダイゼーション法などを行うことからなるDNAレベルの第二段階のスクリーニングの2工程により行うことが好ましい。従って、この2工程のスクリーニングの一方または双方をより容易に行うことができるようにターゲティングベクターをデザインすることが好ましい。

【0056】ポジティブ選別とは、ターゲティングベクターが染色体に導入された胚性幹細胞のみを選別するこ

とを意味する。一般に形質転換に用いられるエレクトロポレーション法により、導入した遺伝子DNAが染色体に組み込まれる確率は、 10^3-10^4 個の細胞に1個程度の頻度であるため、遺伝子DNAが導入された細胞のみを選び出すための配列(ポジティブ選別)をまず考えなければならない。

【0057】ポジティブ選別用マーカー遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子(G418によって選別)、ハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ(BPH)遺伝子(ハイグロマイシン-Bによって選別)、プラスティシジンSデアミナーゼ遺伝子(プラスティシジンSによって選別)、ピューロマイシン耐性遺伝子(ピューロマイシンによって選別)等が使用可能である。ネオマイシン耐性遺伝子が最も好ましい。

【0058】ネガティブ選別とは、非相同組換えを生じた胚性幹細胞を選択的に除くことを意味する。これは、特に対象とする遺伝子がES細胞で発現していないか、発現量が低い場合に、利用しうる。相同組換えは相同領域で生じるが、非相同組換えは多く直線化した導入DNAの両末端で生じる。ネガティブ選別は導入DNAの一端に、これが組み込まれると細胞に毒性を持つ遺伝子を付加することによって行う。ネガティブ選別としては、単純ヘルペスウイルス(HSV)のチミジンキナーゼ(tk)遺伝子、ジフテリア毒素Aフラグメント(DT-A)遺伝子を用いる方法等が知られている。細胞内在性のチミジンキナーゼ(TK)に比し、HSV由来のTKは、より高率にFIAU、ガンサイクロピアなどの核酸類似体をリン酸化する。tk選別は、非相同組換えでHSV tk遺伝子が導入されるとFIAUなどを加えた場合、これがリン酸化されて染色体DNA中に取り込まれDNA合成が阻害されることを利用したものである。DT-Aは、細胞内で伸長因子IIをpolyADPriボシル化してタンパク質合成を阻害する。ES細胞で高い発現活性を有するプロモーターと連結したDT-A遺伝子を用いれば、非相同組換えでこれが染色体に組み込まれた細胞は死滅すると期待される。翻訳レベルの選別で、選択剤を必要としない、という利点を有する。従来、染色体DNAへの組み込み以前に、エピゾーマル(染色体外にある状態)でDT-Aが発現し、細胞をランダムに死滅させてしまいますおそれが危惧されていたが、特に一過性の発現により細胞死はES細胞では起こりにくいことが明らかになりつつある。必要であれば、後述するpolyA選別と組み合わせ、即ちpolyA付加シグナルをつけないでベクターを作製してもよい。

【0059】ES細胞中で強い発現活性を有するプロモーターとしてはホスホグリセリン酸キナーゼ-1(PGK-1)プロモーター、伸長因子2(EF-2)プロモーター、MC-1プロモーターなどを使用することができる。ターゲティングを行う遺伝子座、およびそのDNA領域により、プロモーター活性は大きく影響されるた

10

20

30

40

50

め、一般にはプロモーターは強力であるほどよい。従ってより望ましくは、PGK-1プロモーターを使用する。ただし、ネガティブ選別用にDT-Aを用いる場合は、染色体DNAへの組み込み前のランダムな細胞死が危惧されるため、発現活性のやや劣るプロモーター、例えばMC-1プロモーターを使用するのが好ましい。

【0060】プロモーターと連結した選択マーカー遺伝子は、たとえばネオマイシン耐性遺伝子カセット（neoカセット、pKJ2として供与）、ハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ遺伝子カセット（hphカセット）、チミジンキナーゼ遺伝子カセット（tkカセット、pMCKtkとして供与）、ジフテリア毒素A遺伝子断片カセット（DT-Aカセット、pMCDT-AまたはpMC1DTApAとして供与）、lacZ遺伝子カセット（例えば、pBSlacZとして供与）などの、プラスミドに挿入された状態で市販されている選択マーカー遺伝子を使用してもよい。ターゲティングベクターは、これらのプロモーターを連結した選択マーカーのうち、どの選択マーカーを使用して構築してもよい。後述の実施例では、Nakano et al., Eur J Neurosci 1999 Jul; 11 (7): 2577-81に記載のプラスミドloxP-flanked-pGK-neo（例えば、本発明者の大阪大学医学部 竹田潤二より入手可能）より得たpGK-neo断片、並びに、プラスミドpMC1DTApA（Yagi et al., 1993; Anal. Biochem. 214: 77-86）（大阪大学細胞生体工学センター 八木健教授より入手可能）より得たMC1DTApA断片を使用した。

【0061】好ましくは、ポジティブ選別用、ネガティブ選別用の配列は（存在する場合にはそのプロモーターとともに）セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子と同一方向（順方向）にターゲティングベクターに挿入させる。

【0062】ターゲティングベクターが、ターゲティングベクターが導入された胚性幹細胞のみを選択するための配列、即ちポジティブ選別用配列を含む場合、ターゲティングベクターが導入された染色体はポジティブ選別用配列が挿入されている。ポジティブ選別用配列が残ったままでは、最終的に得られるコンデショナルノックアウト動物において、Lcb2遺伝子そのものの発現を攪乱させる、初期発生期に限らず発育障害を生じる等の悪影響を及ぼす可能性がある。好ましくは、ポジティブ選別用配列を染色体DNAから削除する工程を含む。ネガティブ選別用の配列の削除を容易にするために、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子に関して上述したリコンビネースタンパク質／リコンビネース標的配列システムを利用することができる。よって、限定されるわけではないが、ポジティブ選別用配列を2個の同一方向のリコンビネース標的配列で挟んでターゲティングベクター

に含ませるのが好ましい。ポジティブ選別用配列を削除するための方法については、後述の「6. ポジティブ選別用配列の削除」の項において詳述する。

【0063】さらに利用可能な選別としては、プロモーター選別、polyA選別などが知られている。プロモーター選別は対象となる遺伝子が組換えを生じさせる細胞中で発現している場合に利用可能である。この場合、ポジティブ選別用配列にプロモーターをつけず、相同組換えを起こした場合、対象遺伝子の発現調節領域からポジティブ選別用配列が発現するようベクターを設計し、プロモーター選別を行うことによって、ポジティブ選択で陽性の非相同組換え体の数を減らすことが可能となる。また、polyA選別は、ポジティブ選別用遺伝子にpolyA付加シグナルを付けず、相同組換えが起こった時のみ対象遺伝子のpolyA付加シグナルを利用できるようベクターを設計し、これにより非相同組換え体を除去するものである。ネガティブ選別などと組み合わせたときに特に有用である。

【0064】前述した時期特異的及び／又は組織特異的に、スフィンゴ脂質合成の一部又は全部を不活化した、非ヒトコンデショナルノックアウト哺乳動物の作製方法に使用するためのターゲティングベクター自体も、本発明によって新たに得られたものであり、含まれる。本発明のターゲティングベクターは、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部をリコンビネース標的配列で挟んだ配列を含み、前記配列でセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部を相同組換えすることを特徴とする。

【0065】3. ターゲティングベクターによる相同組換え

次いで、上記の方法により作製したターゲティングベクターを使用して、相同組換えを行う。本発明において「セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子の相同組換え」とは上記改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を、対応するゲノム上に、人工的に組換えさせることをいう。

【0066】一般に、所期の遺伝子の相同組換えが起こる頻度は 10^{-6} 程度であることが知られている。したがって目的とする相同組換え体を得るためには、理論上 10^6 以上の細胞に組換え操作を行う必要があり、少なくとも数十ないし数百検体の組換え体をスクリーニングする必要がある。しかしながら、 10^6 個の受精卵を使用することは事実上不可能であることから、受精卵に変わるものとして、受精卵と同様の多分化能を有し、かつ*in vitro*で培養することが可能な細胞を使用することが必要である。このような目的を達成することができる方法として、胚性幹細胞（ES細胞）を用いる方法、クローン動物作成技術を用いた方法などを使用することができるが、これだけに限定されるものではない。

【0067】現在確立されている遺伝子ターゲティング法では、ES細胞を使用することが望ましい。現時点では、ヒト、ミンク、ハムスター、ブタ、ウシ、マーモセット、アカゲザル等の複数の哺乳動物でES細胞が樹立されている。将来さらに多種の動物で同様なES細胞が樹立されれば、同様な方法を用いて遺伝子改変動物を作製することができる。

【0068】遺伝子改変マウス作製用のES細胞株は、公知のマニュアルを使用して自己で作製してもよいが、既存の樹立されたES細胞株が入手可能であり、好ましい。現在使用することができるマウス由来のES細胞は、TT2細胞、AB-1細胞、J1細胞、R1細胞、E14.1細胞、RW-4細胞などがある。遺伝子改変動物を作出するために、これらのうちいずれのES細胞を用いるかは、採取したゲノムDNAの由来するマウス系統、キメラ動物の選別方法など、実験の目的や方法により任意に決定することができる。所期のES細胞株は必要に応じ、各々特定の研究機関より入手可能である。例えば、本明細書中の実施例で使用したR1細胞は、マウス系統129SVJに由来し、例えば、Andras Nagy, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, (600 University Avenue, Toronto M5G 1X5 Ontario, Canada) より入手可能である。

【0069】前記2の項で作製した、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA領域の一部又は全部をリコンビネース標的配列で挟んだ配列を含むターゲティングベクターをES細胞中に導入する。そしてES細胞中の目的とするセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA配列を、ターゲティングベクター中のリコンビネース標的配列で挟んだセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子配列による相同組換えによって置換する。相同組換えは、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のゲノムDNA配列と、ターゲティングベクター中の非改変部分の配列との相同性を利用して、確率的に生じさせることができる。

【0070】ターゲティングベクターをES細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法など公知の方法を使用することができる。効率、作業の容易性などを考慮して、エレクトロポレーション法を用いることが好ましい。エレクトロポレーションの方法は、例えば、(Nakano et al., Eur J Neurosci 1999 Jul; 11 (7): 2577-81)に記載の方法を使用可能である。

【0071】4. 相同組換え体のスクリーニング

得られた組換えES細胞を、ネオマイシン耐性の初代培養細胞からなるフィーダー細胞レイヤー上、マイトマイ

シンC-処理したNHL7細胞等の選別用プレートにプレートティングする。そしてES培養液中で、相同組換えによってES細胞に導入されたポジティブ選別用マーカ-及び/又はネガティブ選別用マーカ-により、第一段階のスクリーニングである選択培養を行う。当該第一段階の選択工程においては、前述した選択マーカ-のうち、複数の選択マーカ-遺伝子を用いることもできる。ES細胞を培養するための培養液は毎日交換するとよい。培養液中には、選択マーカ-遺伝子の種類に依存して、たとえばネオマイシン (G418, GIBCO BRL) やハイグロマイシンB (Calbiochem) が含まれている。選択培養6-8日目に生存するコロニーを耐性クローンとして採取する。

【0072】耐性クローンをピックアップし、増殖させる。その後、目的とするセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子がターゲティングされているかどうか、即ち相同組換えを起こした形質転換体を確実に選択するため、第二段階のスクリーニングを行うことができる。第二段階のスクリーニングは、DNAレベルで目的とするセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子がターゲティングされたかどうかを確認する工程である。このような方法としては、PCR法、サザンブロットハイブリダイゼーション法などが存在するが、そのうちのいずれを用いてもよく、またその中から2以上の方法を組み合わせる用いてもよい。

【0073】本発明においては、まず、第一段階のスクリーニングにより選択されたES細胞クローンのプールのそれぞれからゲノムDNAを調製し、このゲノムDNAを鋳型としてPCR法を行うことで、ES細胞について第二段階のスクリーニングをする。このPCR法を用いたスクリーニングにより組換えが起こったクローンを単離する。

【0074】PCRプライマーは、ターゲティングにより目的とするゲノムDNA領域を外来性の遺伝子により置換することができたか否かをより効率的に確認できるように設計することが望ましい。そのためにはターゲティングベクターの配列のうち目的とする遺伝子の外側のゲノムDNA領域上と、選択マーカ-遺伝子カセット領域上とに設定し、挿入部位を増幅することができるように設計するとよい。本明細書中の実施例3では、前者として5'側プライマーU3/105、後者として3'側プライマーpGK-1を合成してPCRプライマーとして使用した。

【0075】第二段階のスクリーニングにおいて、ES細胞が相同組換え体であることを確認するため、ES細胞クローンに対してサザンブロットハイブリダイゼーション法による解析を行うことができる。サザンブロットハイブリダイゼーション解析は、ターゲティングベクターに含まれないゲノム領域を認識するプローブとターゲティングベクター中に存在する領域を認識するプロ

ープを併用して行うことが望ましい。二種類のプローブを用いることにより相同組換えのほかに非相同組換えが存在するか否かを知ることができ、目的とするゲノム領域に相同組換えが起こったことをより正確に確認することができるからである。あるいは、ターゲティングベクターが導入された変異型ゲノムと野生型ゲノムとで、サザンブロットにおいて長さの違うバンドが認識されるように、プローブを作製してもよい。

【0076】これらのプローブをどのように設計するかは、ターゲティングベクターを構築する際にどの選択マーカーを使用するかにより、個々具体的に異なる。本発明のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子についてのサザンブロットハイブリダイゼーション解析においては、プローブとして、ゲノムクローンを適宜制限酵素処理することにより得られるゲノムDNA断片と、選択マーカーとして使用するポジティブ選別用遺伝子に対するプローブとを使用してもよい。このようにサザンブロットハイブリダイゼーションの条件は、当業者が適宜改変を加えることができ、必要に応じてサザンブロットハイブリダイゼーション解析に用いるプローブ数を増やして、さらに確実に相同組換え体を選択することもできる。サザンブロットハイブリダイゼーションは、³²P等の放射性同位元素を使用する方法、ディゴキシゲニン等の非放射性ラベルを使用する方法等、公知の方法を用いて行うことができる。感度、簡便性の観点より、ディゴキシゲニンを用いる方法が好ましい。

【0077】ターゲティングベクターでES細胞を形質転換させ、相同組換え体を選別した後に、染色体異常がないことを確認するために、核型分析を行うことが好ましい。核型分析は、例えば、Robertson E. J. (1987) *in Teratocarcinomas and embryonic stem cells - a practical approach*, ed. Robertson, E. J. (IRL Press, Oxford), pp. 108-112等に記載の公知の方法を用いて行うことができる。例えば、マウスの正常な核型は2n=40である。好ましくは、ターゲティングベクターで形質転換を行う前も、使用するES細胞の核型を確認する。

【0078】5. 改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を有する遺伝子改変動物の作製

次いで、相同組換えの結果得られた組換えES細胞を、8細胞期または胚盤胞の胚内に移植する。このES細胞移植胚を偽妊娠仮親の子宮内に移植して出産させることによりキメラ動物を作製することができる。ノックアウト(KO)動物は、現在主にマウスについて作製されている。しかし将来的に種々の動物について受精卵または胚の遺伝子組換え技術が使用できる用になった場合には、それぞれの動物についても作出することができる。

【0079】ES細胞を胚内に移植する方法としては、

たとえばマイクロマニピュレーション法、アグリゲーション(凝集)法(例えば、Kondoh et al., 1999, J. Biochem. Biophys. Methods, 39, 137-142に記載)などが知られているがいずれを用いてもよい。また移植する方法は当業者が適宜改変することができる。マウスの場合、まず、ホルモン剤(たとえば、FSH様作用を有するPMSGおよびLH作用を有するhCGを使用)により過排卵処理を施した雌マウスを、雄マウスと交配させる。その後、8細胞期胚を用いる場合には受精から2.5日目に、胚盤胞を用いる場合には受精から3.5日目に、それぞれ子宮から初期発生胚を回収する。このように回収した胚に対して、ターゲティングベクターを用いて相同組換えを行ったES細胞を*in vitro*において注入し、キメラ胚を作製する。

【0080】一方、仮親にするための偽妊娠雌マウスは、正常性周期の雌マウスを、精管結紮などにより去勢した雄マウスと交配することにより得ることができる。作出した偽妊娠マウスに対して、上述の方法により作成したキメラ胚を子宮内移植し、妊娠・出産させることによりキメラ動物を作製することができる。キメラ胚の着床、妊娠がより確実に起こるようにするために、受精卵を採取する雌マウスと仮親になる偽妊娠マウスとを、同一の性周期にある雌マウス群から作出することが望ましい。

【0081】このようなキメラマウスの中から、ES細胞移植胚由来の雄マウスを選択する。選択したES細胞移植胚由来のオスのキメラマウスが成熟した後、このマウスを純系マウス系統の雌マウスと交配させ、そして次世代産仔にES細胞由来の被毛色が現れることにより、ES細胞がキメラマウスの生殖系列へ導入されたことを確認することができる。ES細胞が生殖系列へ導入されたことを確認するためには、様々な形質を指標として用いることができるが、確認の容易さを考慮して、被毛色により行うことが望ましい。マウスにおいては、野ネズミ色(agouti)、黒色(black)、黄土色(cinnamon)、チョコレート色(chocolate)、および白色(アルビノ、albino)の被毛色が知られているが、使用するES細胞の由来系統を考慮して、キメラマウスと交配させるマウス系統を適宜選択することができる。例えば本発明においては、野ネズミ色(agouti)系統(129マウス)由来のES細胞を使用して作出したオスのキメラマウスを、黒色であるC57BL/6メスマウスと交配させる。そして次世代産仔の被毛色が野ネズミ色(agouti)であることにより、ES細胞がキメラマウスの生殖系列へ導入されたことを確認することができる。このように、胚内に移植された組換えES細胞が生殖系列に導入された動物を選択し、そのキメラ動物を繁殖することにより目的とする遺伝子を欠損する個体を得ることができる。得

られたセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子欠損ヘテロ接合体マウス同士を交配させることにより、目的とする遺伝子欠損ホモ接合体マウスを得ることができる。

【0082】一般に実験動物を用いて研究するためには、系統として確立された動物、すなわち遺伝的にホモの状態の動物を用いることが望ましい。このような動物では、遺伝的背景が詳細に調べられているため、かかる既知の遺伝的背景のもとで、当該動物に施した処置の効果のみを特定できるからである。一方、雑種動物においては種々の遺伝子がヘテロの状態で存在するため、当該動物に対する処置の結果生じた効果が、当該処置にのみ由来するものかまたは遺伝的背景に由来するものかを判別することが困難である。

【0083】KOマウスを含む、遺伝子改変マウスの作成の過程では、ES細胞が生殖系列に導入されたか否かを被毛色の違いを指標にして確認するために、交雑を行い雑種子孫を作製することが工程を必ず行う必要がある。したがって、多くの遺伝子がヘテロの状態で存在するため、結果としてセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子が欠損することのみによる特有の効果を調べることが困難となってしまう。そこで、遺伝子欠損の特有の効果のみを抽出するために、得られた遺伝子欠損マウスを純系のマウス系統と戻し交配し、ターゲティングを行った遺伝子を含むすべての遺伝子について可能な限り遺伝的にホモの状態にすることが好ましい。目的とする遺伝的構成の動物を得るためには、5世代～8世代程度同一系統と戻し交配を行うことが好ましい。戻し交配に用いるマウスは当業者が適宜選択することができる。使用することができるマウスとしては、例えばBALB/c、C57BL/6、DBA11、ICRなどが挙げられるが、これらに限定されない。また、自然交配のみにより戻し交配を行うと長い年月がかかる場合があるので、世代交代を早めたい場合には適宜体外受精技術を用いることもできる。

【0084】このようにして得られたリコンビネース標的配列を含む改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を有する遺伝子改変動物は、公知の若しくは作製した時期特異的及び／又は組織特異的にリコンビネースタンパク質を発現するリコンビネース発現遺伝子改変動物と交配させることによって、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のコンデショナルノックアウト動物の作製を可能とする（後述の7項等）。よって、このような遺伝子改変動物（その卵、精子、受精卵、胚組織・器官培養物等を含む）は、有用であり、本発明の範囲に含まれる。

【0085】6. ポジティブ選別用配列の削除
ターゲティングベクターが、ターゲティングベクターが導入された胚性幹細胞のみを選択するための配列、即ちポジティブ選別用配列を含む場合、ターゲティングベクター

が導入された染色体はポジティブ選別用配列が挿入されている。ポジティブ選別用配列が残ったままでは、最終的に得られるコンデショナルノックアウト動物において、Lcb2遺伝子そのものの発現を攪乱させる、初期発生期に限らず発育障害を生じる等の悪影響を及ぼす可能性がある。よって、本発明の方法は、好ましくは、ポジティブ選別用配列を染色体DNAから削除する工程を含む。

【0086】ポジティブ選別用の配列の削除を容易にするために、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子に関して上述したリコンビネースタンパク質／リコンビネース標的配列システムを利用することができる。よって、限定されるわけではないが、ターゲティングベクターにおいてポジティブ選別用配列を2個の同一方向のリコンビネース標的配列で挟んで含ませ、これを染色体ゲノムに導入する。そして、前項5によって得られた改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を有する遺伝子改変動物を、リコンビネースタンパク質を発現する同種の動物と交配させることによって、リコンビネース活性によってポジティブ選別用配列を削除させることができる。この際、リコンビネースタンパク質は、同様にリコンビネース標的配列で挟まれたセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子（の全部又は一部）は削除せず、ポジティブ選別用配列のみを選択に削除させる必要がある。

【0087】具体的な方法論は、例えばDyneck i, S. M. ら（2000、Gene Targeting - a practical approach, 2nd edition, ed. Joyn er, A. L. (Oxford Univ. Press), pp. 68-73）に記載されている。

【0088】もっとも効率的な方法の1つとしては、ポジティブ選別用配列を挟み込むリコンビネース標的配列を、改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子に用いたリコンビネース標的配列とは別のリコンビネース由来のものにしておき、目的に応じてそれぞれ異なるリコンビネースを発現する遺伝子改変動物と交配することが考えられる。具体的には、ポジティブ選別用配列を酵母由来のFRTで、改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子をバクテリオファージ由来のloxPで挟んでおく。これをマウス又はES細胞においてFRTを標的とするリコンビネースflpを作用させて、ポジティブ選別用配列だけを削除できる。このとき、flpはloxPに作用できないために、改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子は削除されない。

【0089】これに対し、本明細書で後述する実施例2で作成したターゲティングベクターは、2つのリコンビネース標的配列でポジティブ選別用配列を挟み、さらに同種のもう1つのリコンビネース標的配列でセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子の一部（第3エクソ

ン)を挟んだ「3リコンビネース標的配列型」である。この場合、リコンビネースの種類の相違を利用する上記の方法は使えない。但し2種類のリコンビネース標的配列を使う上記の方法に比べ、ターゲッティングベクターの構築が簡単なる利点がある。この場合、哺乳動物個体又はES細胞において対応するリコンビネースを限定的に発現させ、ポジティブ選別用配列だけが削除されたものを選択することが可能である。

【0090】例えば、本明細書の実施例6では、Lakso, M. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 5860-5865に記載のEIIaCreトランスジェニックマウス(例えば、米国国立衛生研究所(NIH)(USA)のHeimer Wastphal博士より入手可能)を使用した。EIIaCreトランスジェニックマウスは、以下のような機構により、ポジティブ選別用配列のみを削除させたものを得ることが可能である。

【0091】EIIaCreトランスジェニックマウスは生殖細胞及びそれら受精卵においてもCreリコンビネースが発現するとされている(Lakso, M. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 上記)。しかしながら、実際に2つのloxP(flox)を含むマウスと交配させた結果得られる子供(F1)では2つのloxP間配列の削除型は全身でモザイク状である。さらにF1と野生種を交配させて得られ、かつEIIaCre遺伝子を含まないF2において単一の削除型になることから、その発現量・状態は個体間、もしくは同一組織内細胞間においても大きく異なると考えられている(未発表データ)。「3リコンビネース標的配列型(3loxP型)」の場合は、例えばこの性質を利用して、EIIaCreトランスジェニックマウスと交配することでポジティブ選別用配列だけが削除されたマウスを得ることができる。

【0092】さらに、ポジティブ選別用配列の削除のためにはリコンビネース活性が必要であるが、次項の7.セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のコンデショナルノックアウト動物の作製に使用するためには、リコンビネース遺伝子がセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子と同一ゲノム上に存在しないのが好ましい。よって、好ましくは、交配を行って得られた第一世代(F1)の遺伝子改変マウスを野生型のマウスと戻し交配し、そして、第2世代(F2)において、ポジティブ選別用配列が削除されて存在せず、かつ、リコンビネース遺伝子を有しないヘテロ接合体を選択する。好ましいヘテロ接合体の選択は、上記4項のスクリーニングに用いた、PCR法、サザンブロッティング法等を用いた行うことができる。

【0093】また、ポジティブ選別用配列を削除させた

ヘテロ接合体を得た後に、5の項で詳述したように遺伝的にホモの状態の動物を得るために、必要に応じて交配を行ってもよい。

【0094】あるいは、ポジティブ選別用配列の削除は、前記4において得られた相同組換えされたES細胞を、哺乳動物に形質転換させる前に、ES細胞のレベルで行うことも可能である。例えば、以下のように行うことができる。

【0095】概念は、例えばDynecki, S. M.ら(2000, Gene Targeting - a practical approach, 2nd edition, ed. Joyner, A. L. (Oxford Univ. Press), pp. 68-73)に記載されている。以下は、例示としてTaniguchi, M.ら(Nucleic Acids Res. 1998 Jan 15; 26(2): 679-80.)に記載されている。

【0096】具体的には、3リコンビネース標的配列型(3loxP型)の改変ES細胞に、まず、選択マーカーとしてピューロマイシンN-アセチル転移酵素(ピューロマイシン耐性遺伝子)をもつCre発現ベクター(pCre-pac)を、後述の実施例3で挙げるような方法で形質導入する。導入後、例えば2日間のみピューロマイシンでCreが発現したものだけをポジティブ選択する。次いで、PCR法、サザンブロッティング法等を用いて、ポジティブ選別用配列のみが削除されたクローンを選び出すことが可能となる。

【0097】7.セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のコンデショナルノックアウト動物の作製

次いで、前記遺伝子改変動物を、時期特異的及び/又は組織特異的にリコンビネースタンパク質を発現するリコンビネース発現遺伝子改変動物と交配し、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のコンデショナルノックアウト動物を得る。

【0098】リコンビネースタンパク質自体は、特に個体に毒性を示さないため、時期特異的及び/又は組織特異的にリコンビネースタンパク質を発現するリコンビネース発現遺伝子改変動物は例えば、以下のようにして作製させることができる。

【0099】概念は、例えばDynecki, S. M.ら(2000, Gene Targeting - a practical approach, 2nd edition, ed. Joyner, A. L. (Oxford Univ. Press), pp. 75-81)に記載されている。

【0100】一般的には、時期特異的及び/又は組織特異的に発現を可能とするプロモーター配列にリコンビネース発現配列をつないだ遺伝子をもつ遺伝子改変動物を作製する。この遺伝子改変動物の作製法としては、トランスジェニック法とノックイン法が存在する。トランス

ジェニック法は、前記の遺伝子を外部から導入する方法で、遺伝子を受精卵に直接注入する事で得る。ノックイン法は内在性プロモーターの後ろに相同組換えでリコンビネース発現配列を導入する方法で、該当プロモーターのターゲティングベクターを構築しES細胞に形質転換し、適当な改変ES細胞を選び出し、それから遺伝子改変動物を作製する。

【0101】トランスジェニック法はノックイン法に比べると実験過程が少なくより迅速に遺伝子改変動物を得ることができるが、外部から導入したプロモーターは内在性プロモーターに比べて特異性が落ちるために標的とした時期及び／又は組織においてリコンビネースタンパク質が発現しない場合がある。またトランスジェニック法特有の現象として、外部から導入された遺伝子が上手く発現しないことがあり、最近ではノックイン法が主流になりつつある。

【0102】あるいは、時期特異的及び／又は組織特異的にリコンビネースタンパク質を発現するリコンビネース発現遺伝子改変動物として研究機関より入手可能なもの、または市販されているものを利用することも可能である。特にCre-loxPシステムについては研究がすすんでいる。その多くは、Samuel Lunenfeld Research Institute (Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada) のAndras Nagy博士のホームページ (<http://www.mshri.on.ca/nagy/>) にて紹介されている。

【0103】例えば、本明細書の実施例で使用したCreを表皮のみで特異的に発現するK5-CreTgトランスジェニックマウス、及びT細胞のみで特異的に発現するIck-Creトランスジェニックマウスは、本発明者の大阪大学医学部 竹田潤二より入手可能である。さらに、Creを神経細胞特異的に発現するネスチン(nestin)-Creトランスジェニックマウス、B細胞特異的に発現するCD19-Creトランスジェニックマウス等も知られている。遺伝子改変動物において、リコンビネース遺伝子はホモの状態でもヘテロの状態でも存在していてもよい。

【0104】またリコンビネース発現遺伝子改変動物の代替として、リコンビネース発現ベクターもしくはリコンビネースタンパク質を、リコンビネース標的配列を組み込んだ所期の遺伝子改変動物に、ウイルス、金粒子を細胞に直接打ち込むパーティクル銃、軟膏等を介した方法により限定的に導入する方法も本発明において利用可能である。

【0105】上記時期特異的及び／又は組織特異的にリコンビネースタンパク質を発現するリコンビネース発現遺伝子改変動物を、先の5項(または6項)で得られた、リコンビネース標的配列を含む改変セリンパルミ

トイルトランスフェラーゼ遺伝子を有する遺伝子改変動物のホモ接合体またはヘテロ接合体と交配し、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のコンディショナルノックアウト動物を得る。

【0106】具体的には、まず、リコンビネース発現遺伝子改変動物においてホモの状態でも野生型のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子が存在する場合には、これをヘテロの状態でも欠失させる工程が必要である。上述したようにセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子がホモで欠失し、完全に不活化すると胎生致死である可能性が高い。よって、まずリコンビネース発現遺伝子改変動物であって、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子をヘテロの状態でも欠失した遺伝子改変動物を得る必要がある。これは、生殖細胞でリコンビネースを発現する遺伝子改変動物(例えば、EIIa-Creトランスジェニックマウス、CAG-Creトランスジェニックマウス)を、先の5項(または6項)で得られた、本発明のリコンビネース標的配列を含む改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を有する遺伝子改変動物のホモ接合体またはヘテロ接合体(好ましくはホモ接合体)と交配する。そして、先の6項と同様にPCR法、サザンブロッティング法等を用いて、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子をヘテロの状態でも欠失した好ましいヘテロ接合体を選別することができる。このヘテロ接合体は、リコンビネースが発現する特定の時期及び／又は組織において、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子をヘテロの状態でも欠失している。

【0107】あるいは、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子をヘテロの状態でも欠失させるという目的においては、本発明のリコンビネース標的配列を含む改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を有する遺伝子改変動物と交配させるという手法に限定されない。公知のノックアウト遺伝子改変動物作製のための手法を用いて、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子をヘテロの状態でも欠失したノックアウト遺伝子改変動物を得ることが可能である。

【0108】次いで、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子をヘテロの状態でも欠失したノックアウト遺伝子改変動物をさらに、先の5項(または6項)で得られた、リコンビネース標的配列を含む改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を有する遺伝子改変動物のホモ接合体またはヘテロ接合体(好ましくはホモ接合体)と交配する。すると、前者に由来するセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を欠失した染色体と、後者に由来するリコンビネース標的配列を含む改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を有する染色体を有する子孫が一定の割合で得られる。これは、リコンビネースが時期特異的及び／又は組織特異的に発現することにより、セリンパルミトイルトランスフェラ

ーゼタンパク質の発現が時期特異的及び／又は組織特異的に抑制される非ヒト哺乳動物、即ちセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子のコンディショナルノックアウト動物を提供する。

【0109】また、本発明における実験は、動物実験に対する研究所内倫理ガイドラインおよび遺伝子操作実験に対する安全性ガイドラインに基づいて行う。

【0110】

【発明の効果】本発明のコンディショナルノックアウト哺乳動物は、生体膜機能を始めとした哺乳類におけるスフィンゴ脂質の生理的機能の研究に関し、非常に有力な道具を提供する。本発明のコンディショナルノックアウト哺乳動物では、セリンパルミトイルトランスフェラーゼタンパク質の発現が時期特異的及び／又は組織特異的に制御する。よって、スフィンゴ脂質が発生・成長におけるどの時期に、生体のどの場所で、どのような生理的機能を果たしているかを、セリンパルミトイルトランスフェラーゼタンパク質の発現を欠失させる時期及び／又は組織を、様々に、例えば、系統的に制御することによって調べることが初めて可能となった。

【0111】例えば、スフィンゴ脂質合成機能を個体全体、即ち受精卵のレベルから欠失した場合、マウス個体は初期発生を乗り越えられないことが示された（実施例7）。

【0112】また、スフィンゴ脂質合成機能を表皮特異的に欠失するマウスは、体毛が全く生えない、生える場合でも野生型に比べて少ないことが観察された（実施例8）。そして、4週齢までに全て死亡してしまった。また、炎症をおこしていると思われるマウスも散見された。この、スフィンゴ脂質合成機能を表皮特異的に欠失するノックアウトマウスは、特にスフィンゴ脂質は細胞膜構成成分として機能の研究に有用である。また、体毛が野生型と比較して少ない、又はほとんどない性質から、皮膚移植の研究、医薬組成物、化粧品、栄養補助食品、生活改善製品等の組成物若しくは化合物の皮膚への影響を研究するためのモデル動物として有用である。

【0113】さらに、スフィンゴ脂質合成機能をT細胞特異的に欠失するマウスは、T細胞の分化および成熟度が低下することが観察された（実施例9）。このマウスは、特にT細胞が関連する免疫系の研究、例えば、免疫機能攪乱を伴う遺伝的疾患とアレルギーの機序解析及び治療法の確立、免疫抑制剤の開発等に有用である。

【0114】スフィンゴ脂質、特にガングリオシド（スフィンゴ糖脂質）は、脳を代表とする神経系組織に多く含まれる脂質として分類されている。その組成は各神経組織によって大きく異なることから、古くから各機能との関連性が示唆されている。よって本発明において得られるスフィンゴ脂質合成機能を各神経組織特異的に欠失させた遺伝子改変哺乳動物は、近年進展が著しい脳機能研究において多いに有用であると期待される。

参考文献

1. 「カベオラとラフト」藤本ら、細胞工学 Vol. 18, No. 8, 1999, p. 1155-1161;
2. 「T細胞抗原受容体シグナル伝達におけるラフトの役割」安田ら、蛋白質 核酸 酵素 Vol. 45, No. 11 (2000), p. 1812-1822.
- 【0115】3. Journal of Biological Chemistry, Vol. 267, 1992, p. 23527-23533
4. Hanada, K et al., Journal of Biological Chemistry, Vol. 272 (51), 1997, p. 32108-32114
5. Nagiec, M. M. et al., Gene 1996 Oct 24; 177 (1-2): 237-41
6. 別冊 実験医学 ザ・プロトコールシリーズ「ジーンターゲティングの最新技術」（2000年、羊土社）コンディショナルターゲティング法 p. 115-120
7. バイオマニュアルシリーズ8 「ジーンターゲティング」-ES細胞を用いた変異マウスの作製（1995年、羊土社）p. 71-77)
8. Sambrookら, Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL, 第3版, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, 2001年, 4. 82-4. 85
9. Nakano et al., Eur J Neurosci 1999 Jul; 11 (7): 2577-81
10. Yagi et al., 1993; Anal. Biochem. 214; 77-86
11. Robertson E. J. (1987) in Teratocarcinomas and embryonic stem cells—a practical approach, ed. Robertson, E. J. (IRL Press, Oxford), pp. 108-112
12. Kondoh et al., 1999, J. Biochem. Biophys. Methods, 39, 137-142
13. Dynecki, S. M. et al., 2000, Gene Targeting—a practical approach, 2nd edition, ed. Joyner, A. L. (Oxford Univ. Press), pp. 68-73
14. Lakso, M. et al., 199

- 6, Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 93, 5860-5865
15. Taniguchi, M ら, Nucleic Acids Res. 1998 Jan 15; 26 (2) : 679-80
16. Dynecki, S. M. et al., 2000, Gene Targeting - a practical approach, 2nd edition, ed. Joyner, A. L. (Oxford Univ. Press), pp. 75-81
17. Osuka, S. et al., Cytogenet Cell Genet 1998; 82 (3-4) : 222-3
18. Nagy et al., 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90; 8424-8428
19. Taniguchi et al., EMBO J. 1995 14 : 3664-3678
20. 松崎有未他著 (1999)、フローサイトメトリ自由自在、中内啓光監修 (秀潤社) pp 3-13
- 【0116】

【実施例】以下、実施例によって本発明を説明するが、実施例は例証のためのものであり、本発明を制限するものではない。本発明の範囲は、請求の範囲の記載に基づいて判断される。さらに、当業者は本明細書の記載に基づいて、容易に修正、変更を加えることが可能である。

【0117】実施例1 マウスLcb2遺伝子のエクソン3を含むゲノムDNAのスクリーニング

まずマウスLcb2タンパク質の全長アミノ酸配列 (Nagiec, M. M. et al., Gene 1996 Oct 24; 177 (1-2) : 237-41) をコードするcDNA (配列番号: 2) を、ランダムプライムラベル法により³²P-dCTP存在下でラベルした。これをプローブとし、129SVJマウスゲノムライブラリーをスクリーニングした。

【0118】陽性ファージクローンの制限酵素切断部位および塩基配列を調べたところ、別個の独立した2種類のLcb2遺伝子の染色体DNA断片 (Lcb2-A, Lcb2-B) をもつファージクローン (A, B) が得られた。Lcb2-AおよびLcb2-Bの制限酵素地図を図3に記載する。

【0119】マウスのLcb2タンパク質をコードするcDNAの塩基配列は公知であり、例えば、Gene bank accession No. U27455に開示されている (配列番号: 2)。Lcb2-Aはエクソン2 (配列番号2のcDNAの塩基148ないし342に相当) のみを含む全長約12.6kbの断片、Lcb2-Bはエクソン3 (cDNAの塩基343ないし497に相当)、4 (cDNAの塩基498ないし646)、5 (cDNAの塩基647ないし771)、6

(cDNAの塩基772ないし865) まで含む全長約13kbの断片であった。

【0120】このうち染色体DNA断片Lcb2-BをプローブとしてFISH (fluorescence in situ hybridization) を行った。その結果、マウスLcb2遺伝子が12番染色体のE領域に存在する1染色体あたり1コピーの遺伝子であることが確認された (Osuka, S. et al., Cytogenet Cell Genet 1998; 82 (3-4) : 222-3)。

【0121】実施例2 ターゲティングベクターの作製
図4に示した戦略に沿って、ターゲティングベクターを作製した。

1) pBS-Lcb2B (1) floxed pGK-neoの作成

前記ファージクローンBよりDNAを抽出し、Not Iで切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、Lcb2-B (約13kb) を回収し、これをNot Iで切断したプラスミドpBluescript II KS+ (Stratagene社製) とT4リガーゼを用いて結合させ、大腸菌DH5α (TOYOBO等より入手可能) を形質転換してプラスミド「pBS-Lcb2B」を得た。

【0122】前記プラスミドpBS-Lcb2BをNot IとXho Iで切断し、1%アガロースゲル電気泳動を行った。約5kbに相当するDNA断片を回収し、Not IとXho Iで切断したプラスミドpBluescript II KS+ (Stratagene社製) とT4リガーゼを用いて結合させた。次いで、これを用いて大腸菌DH5αを形質転換し、プラスミド「pBS-Lcb2B (1)」を得た。

【0123】一方、プラスミドloxP-flanked-pGK-neo (Nakano et al., Eur J Neurosci 1999 Jul; 11 (7) : 2577-81) (本発明者の大阪大学医学部

竹田潤二より入手可能) をNot Iで切断し、T4 DNAポリメラーゼを用いて平滑末端化した。次いで、1%アガロースゲル電気泳動を行い、pGK-neo発現ユニットがloxPで挟まれた部分に相当する、約2.3kbのDNA断片を回収した。これを前記プラスミドpBS-Lcb2B (1) をEcoO109 Iで切断し、T4 DNAポリメラーゼを用いて平滑末端化したものとT4リガーゼを用いて結合した。次いで、これを用いて大腸菌DH5αを形質転換し、プラスミド「pBS-Lcb2B (1) floxed pGK-neo」を得た。

【0124】但し、この方法ではpGK-neo発現ユニットがpBS-Lcb2B (1) floxed pGK-neoに対して両方向に入る可能性がある。順方向に挿入されたものはEcoR Iで切断したときに4.3

k bに相当するDNAフラグメントが得られる。そこで前項で得られたプラスミドをEcoRIで切断し1%アガロースゲル電気泳動を行い、4.3 kbのバンドが得られたものをpBS-Lcb2B(1) floxed pGK-neoとして、以降使用した。

【0125】2) pBS-Lcb2B(2) loxPの作成

pBluescript II KS+をHindIIIで切断し、T4DNAポリメラーゼを用いて平滑末端化した。次いで、1%アガロースゲル電気泳動を行い、T4リガーゼを用いて結合した。次いで、これを用いて大腸菌DH5αを形質転換し、プラスミドpBKS(HindIII(-))を得た。

【0126】1) の工程中で得られたプラスミドpBS loxP 上流(配列番号: 4) :

5' -ataacttcgtataatgtatgctatacgaagtataagcttgca-3'
3' -acgttattgaagcatattacatacgaatgcttcaatattcga-5'
(EcoT22I) loxP
loxP 下流(配列番号: 5) :

その後、両者を5 μMになるよう混合し、95℃、20分煮沸し後一晩かけて室温に冷却することで、それぞれの相補部分間で会合して合成2本鎖DNA「loxP-HindIII(EcoT22I)」を作製した。loxP-HindIII(EcoT22I)は、中央に34塩基配列からなるloxP配列(下線部分)を持ち、3'末端側にHindIII切断部位(aagctt)、また両末端にはEcoT22I(NsiI)切断部位に相当する4塩基(tgca)からなる突出末端を持つ。

【0129】次に、前記プラスミドpBS-Lcb2B(2)をEcoT22Iで切断し、1%アガロースゲル電気泳動を行った。5 kbに相当するバンドを回収後、これに前記2本鎖合成DNA「loxP-HindIII(EcoT22I)」をT4リガーゼを用いて結合させた。次いで、これを用いて大腸菌DH5αを形質転換し、プラスミド「pBS-Lcb2B(2) loxP」を得た。

【0130】但し、この方法ではloxP-HindIII(EcoT22I)が多重にかつ順・逆方向に挿入される。pBS-Lcb2B(2) loxPの塩基配列を決定することで、loxP-HindIII(EcoT22I)が一つのみ順方向(即ち、HindIIIがpBS-Lcb2B(2)内のLcb2遺伝子の下流にそろうように)に挿入されたものを選択した。

【0131】3) プラスミドLcb2TV3DTApA(ターゲティングベクター)の作成

1) で作成したプラスミドpBS-Lcb2B(1) floxed pGK-neoをXbaIとNdeIで切

1-Lcb2B(1)をEcoRV及びXhoIで切断した。切断反応物を1%アガロースゲル電気泳動し、約1.9 kbに相当するDNA断片を回収した。当該DNA断片を、EcoRVとXhoIで切断した前記プラスミドpBKS(HindIII(-))とT4リガーゼを用いて結合した。次いで、これを用いて大腸菌を形質転換してプラスミド「pBS-Lcb2B(2)」を得た。

【0127】まず下に挙げる2つの合成プライマーを作製し、T4 DNAキナーゼによりそれぞれの5'末端をリン酸化した;

【0128】
【化2】

HindIII
(EcoT22I)

断し、1%アガロースゲル電気泳動を行い、約4.8 kbのDNA断片を回収した。同様の操作を行い、2)で作成したプラスミドpBS-Lcb2B(2) loxPをNdeIとXhoIで切断し約1.7 kbのDNA断片を得た。また、1)の工程中で得られたプラスミドpBS-Lcb2B(1)をXhoIとAsp718Iで切断して約5 kbのDNA断片を、そしてプラスミドpBluescript II KS+をAsp718IとXbaIで約3 kbのDNA断片を回収した。次にこれら4つのDNA断片をT4リガーゼを用いて結合させ、大腸菌DH5αを形質転換してプラスミド「Lcb2TV3」を得た。

【0132】一方、プラスミドpMC1DTApA(Yagi et al., 1993; Anal. Biochem. 214; 77-86)(大阪大学 細胞生体工学センター 八木健教授より入手)をNotIで切断後、T4DNAポリメラーゼを用いて平滑末端化した。次に、XhoIにて切断した。さらに1%アガロースゲル電気泳動を行い約1.3 kbに相当するDNA断片を回収し、これを「MC1DTApA」とする。

【0133】次に、別途プラスミドpBluescript II KS+をAsp718Iで切断後T4DNAポリメラーゼを用いて平滑末端化した。次に、XhoIで切断し、1%アガロースゲル電気泳動を行い、約3.0 kbに相当するDNA断片を回収した。これを前記MC1DTApAとT4リガーゼを用いて結合させ、大腸菌を形質転換してプラスミド「pBS/MC1DTApA」を得た。

【0134】前記プラスミドLcb2TV3とプラスミ

ドpBS/MC1DTApAを各々Asp718Iで切断後T4DNAポリメラーゼを用いて平滑末端化し、次にNotIにて切断した。さらに1%アガロースゲル電気泳動を行い、それぞれ約4.2kbと約11.5kbに相当するDNA断片を回収した。両者をT4リガーゼを用いて結合し、大腸菌DH5αを形質転換し、プラスミド「Lcb2TV3DTApA」を得た。以降、プラスミド「Lcb2TV3DTApA」をLcb2ノックアウト(KO)作成用ターゲティングベクターとして使用した。

【0135】実施例3 ES細胞へのターゲティングベクターの導入

ES細胞は、Nagy et al., 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90; 8424-8428に記載のR1細胞(Antras Nagy, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, (600 University Avenue, Toronto M5G 1X5)より入手可能)を使用した。以下の実施例で細胞の培養は、全て37℃の5%CO₂培養器中で行った。

【0136】20%FBS(Fetal Bovine Serum:ウシ胎児血清、Life Tech社等)及び1000単位/mlのmLIF(leukocyte inhibitory factor)(商品名:ESGRO(商標))(Chemicon社製)を添加したDMEM培地(ダルベッコ修正イーグル培地)(Life Tech社等)(以下、「ES用培地」と言う)で維持しているR1細胞に対し、実施例2で作成したLcb2KOターゲティングベクター(「Lcb2TV3DTApA」)をNotIで切断したものを20μg使用し、エレクトロポレーション法(Nakano et al., Eur J Neurosci 1999 Jul; 11(7): 2577-81)により導入した。

【0137】具体的には、エレクトロポレーションを実施する前日に、新鮮なES用培地と交換したR1細胞を集め、エレクトロポレーション用溶液(20mM HEPES, pH7.05, 137mM NaCl, 5mM KCl, 0.7mM Na₂HPO₄, 6mM デキストロース)で洗浄した。10⁷個のR1細胞を、NotIで線状化した20μgのターゲティングベクター「Lcb2TV3DTApA」と0.8mlのエレクトロポレーション用溶液を用い、エレクトロポレーション用キュベットの中で混合した。その後mBio-Rad GenePulser(バイオラッド社製)を使用して、240V、500μFの条件で電気パルスを与えた。

【0138】10mlのES用培地に懸濁後、遠心分離によりES細胞を回収し、6mlのES用培地に懸濁

し、予め8mlのES用培地中にフィーダー細胞を播いてある10mlディッシュ1枚あたりにこのES細胞懸濁液を2mlを加え、12-18時間後に力価150μg/mlのG418(Gibco BRL社製)を添加して、1週間培養した。

【0139】なお、フィーダー細胞としては、本発明者がHS1ノックアウトマウス(Taniuchi et al., EMBO J. 1995 14: 3664-3678)の雄と野生型のICR系統の雌と交配し、12日ないし13日胚から分離して樹立した繊維芽細胞を使用した。

【0140】実施例4 相同組換えを起こしたES細胞の選択

実施例3において、G418の添加後7日間培養して生じてきたES細胞のコロニーを採取した。LCB2CKOターゲティングベクターにネガティブ選択用にジフテリア毒素A(DTA)サブユニット発現カセットを組み込んでいるために、非相同組換え体の多くはコロニー形成以前に除去される。

【0141】各コロニーを二分し、一方は培養を継続した。もう一方は所期の相同組換えを起こしているクローンを選択するためにPBS-にて洗浄し、Proteinase K処理を行った後、染色体DNAを回収してPCRによりクローンを選択した。

【0142】PCRにおいて用いた合成プライマーの塩基配列は次の通り;

【0143】

【化3】プライマー U3/105(配列番号:6):
5'-gtgctgctaggggtttccatttc
agccacat-3'

(構築したターゲティングベクターの外側にある塩基配列)

プライマー pGK-1(配列番号:7):

5'-tagtgagacgtgctacttccattt
gttcacg-3'

(neo遺伝子発現ユニットの外の塩基配列)

PCRの実験条件は、94℃1分、60℃1分、68℃3分を1サイクルとして30サイクル行い、PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動を行い、正しく相同組換えを行った際に予想されるPCR産物(約2.2kb)に相当する位置にバンドを生じたクローンを陽性と判断した。この方法により採取した224個のクローンのうち16個に陽性が認められた。

【0144】相同組換えをより正確に確認するために、前項で陽性が認められた16クローンのおのについて培養を継続し、増殖したES細胞の一部から染色体DNAを抽出し、以下のようにサザンブロッティング法を行った。

【0145】染色体DNA20μgをHindIIIで切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、ナイロン

メンブレンHybond-N+ (アムシャム・ファルマシア・バイオテック社製) に対して10xSSC溶液でキャピラリー法により転写した。構築したターゲッティングベクターのすぐ5' 外側にあるXbaIとHindIIIで切断した染色体DNA断片(433bp、「5'プロンプター」)をプロンプターとし、染色体DNA転写膜に対しdデオキシジグニニン(DIG)ハイブリダイゼーションシステム(ロッシュ・ダイアグノスティック社製)によりザザンブロッティングを行った。

【0146】変異が導入されなかった野生体は約5.9kbのバンドを、正しく相同組換えを行ったものは約2.5kbのバンド予想がされる。16クローン全てに約5.9kbと約2.5kbのバンドが1:1で認められた(ヘテロ接合体)。

【0147】染色体DNA20μgをSacIで切断後、0.8%アガロースゲル電気泳動を行い、ナイロンメンブレンHybond-N+へキャピラリー法により10xSSC溶液で転写した。前記5'プロンプターを使用して転写膜に対しDIGハイブリダイゼーションシステムによりザザンブロッティングを行った。

【0148】正しく相同組換えを行ったものは約10.5kbのバンドを示すが、変異が導入されなかった野生体は約8.5kbのバンドを、そして非相同組換え体を含む場合はこれ以外のサイズのバンドを示す。上記16クローンのうち、4クローンに非相同組換え体を示唆するサイズのバンドが認められた。

【0149】染色体DNA20μgをHindIIIで切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、ナイロンメンブレンHybond-N+へキャピラリー法により10xSSC溶液で転写した。ネオマイシン耐性遺伝子の全長に相当するプロンプターにより転写膜に対しDIGハイブリダイゼーションシステムによりザザンブロッティングを行った。

【0150】エクソン3の3'側のloxP配列が正しく挿入された相同組換えを行っていれば、約3.4kbに相当するバンドが確認される。一方3'側のloxP配列が挿入されていない場合は約5.9kbのバンドが認められる。

【0151】非相同組換え体を含まない相同組換え体12クローンに対し、7クローンに3'側のloxP配列が正しく挿入されていることが確認された。この7クローンに対し、染色体異常が無いことを確認するために核型分析を行った(Robertson E. J.

(1987) in Teratocarcinoma and embryonic stem cells - a practical approach, ed. Robertson, E. J. (IRL Press, Oxford), pp. 108-112)。このうち5クローンについて正常な核型(2n=40)が認められた。

【0152】実施例5 改変セリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子を有する遺伝子改変動物の作製

以上の工程から得られた相同組換え体ESクローンと同じ染色体DNAを持つマウスの作製をアグリゲーション法(Kondoh et al., 1999, J.

Biochem. Biophys. Methods, 39, 137-142)により行った。

【0153】相同組換えを起こしていることが確認されたES細胞の培養を、約24時間毎に継代し4日間継続した後、細胞をトリプシン処理によりばらばらに分散した。マウスBDF1系統の雄を掛け合わせた同系統の雌より8細胞期胚を取出した。前記胚より透明帯を外した後、バラバラにした上記ES細胞を接着させた(20ES細胞/8細胞期胚1個)。これを偽妊娠処理した雌マウスの子宮に移し、胎児の発生を継続させることによりキメラマウスを得た。

【0154】このキメラマウスの雄を黒色であるC57BL/6の雌と交配し、生まれてきた仔マウスのうち野ネズミ色(agouti)のものを選び、その尾の一部を切断した試料から染色体DNAを抽出した。実施例4で述べたサザンブロッティング法(HindIII切断・「5'プロンプター」検出)により遺伝子変異が全身に導入されたマウスを確認した。

【0155】上述した方法により、5つの相同組換え体ESクローンから、先ず計26匹のキメラマウスを作出した。そのうち10匹を交配し、74匹の仔マウスを得た。サザンブロット法によりそのうち27匹に遺伝子変異が全身に導入されたものを確認し、変異Lcb2遺伝子について「ヘテロ」接合体を得た。さらに、前記「ヘテロ」接合体同士を交配して、変異Lcb2遺伝子「Lcb2target」について「ホモ」接合体を得た。

【0156】実施例6 Neo遺伝子の削除

この段階でマウス染色体上のマウスLcb2遺伝子に導入された変異には、ネオマイシン遺伝子発現カセットが挿入されている。この発現カセットを削除する目的でEIIaCreトランスジェニックマウス(Lakso, M. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 5860-5865)(米国国立衛生研究所(NIH)(USA)のHeimer Wastphal博士より入手)と交配した。EIIaCre遺伝子発現カセットにより発現されたCreリコンビネースの活性により、loxPに挟まれたneo遺伝子発現カセットが切り出される。

【0157】具体的には、実施例5で得られた変異Lcb2遺伝子を持つマウス(雄)(ホモ接合体)とホモ接合体EIIaCreトランスジェニックマウス(雌)を交配し、neo遺伝子発現カセットが削除された第一世代(F1)マウスを得た。得られたマウスにおいて、neo遺伝子発現カセットの削除が認めれるマウスを実施例4に記載のサザンブロッティング(HindIII切断

・「5' プローブ」検出)によりスクリーニングした。具体的には、neo遺伝子発現カセットのみが削除された場合(「Lcb2floxed」)には約3.6kbのバンドが確認される。一方、EIIaCre遺伝子発現カセットの検出には、尾の一部から抽出した染色体DNAに対してサザンブロッティングを行った。染色体DNA 20μgをBamHIで切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、キャピラリー法によりナイロンメンブレンHybond-N+に10xSSC溶液で転写した。Cre遺伝子の一部に相当するDNA断片(EcoRI切断による1.1kbp, Creプローブ)をプローブとし、転写膜に対しDIGハイブリダイゼーションシステムによりサザンブロッティングを行った。EIIaCre遺伝子を持つマウスは、約5.5、4.5、2.5kbのバンドが認められる。

【0158】上記の方法により変異Lcb2遺伝子を持つマウス(雄)(ホモ接合体)とホモ接合EIIaCreトランスジェニックマウス(雌)1組から計10匹(雄3匹、雌7匹)のキメラマウスF1が得られた。そのうち、雄1匹にneo遺伝子発現カセットの削除が強く認められ、また、EIIaCre遺伝子がヘテロで存在した。

【0159】次に、前記キメラマウス(雄)を野生型のC57BL/6マウス(雌)と交配し、第二世代(F2)(「ヘテロ」接合体)を9匹(雄4匹、雌5匹)得た。このうち、HindIII切断・5'プローブ検出のサザンブロッティングによりLcb2floxedバンド(約3.6kb)と野生型のバンド(約5.9kb)を1対1で示すものを選別した。サザンブロットによりLcb2floxedと野生型のバンドが1対1に近いものが雄2匹において認められたが、全てEIIaCre遺伝子をヘテロにて持っていた。

【0160】EIIaCre遺伝子発現カセットはゲノム中に組み込まれていない方が好ましい。そこで、雄1匹を再度野生型のC57BL/6(雌)と交配させ、F3を10匹(雄4匹、雌6匹)を得た。このうち、前記サザンブロットを利用したCre遺伝子の検出法により、EIIaCre遺伝子発現カセットを持たないマウスを所期のヘテロ接合体として選別した。その結果、Lcb2floxedと野生型のバンドが完全に1対1でかつEIIaCre遺伝子を持たないものが雌3匹得られた。

【0161】さらに、前記選別されたヘテロ接合体同士を交配して、neo遺伝子が削除された変異Lcb2遺伝子「Lcb2floxed」について「ホモ」接合体を得た。実施例2-6に記載した、本発明のコンディショナルノックアウトマウス作製の戦略の流れを図5に示した。

【0162】実施例7 CAG-Creトランスジェニックマウスを用いたスフィンゴ脂質合成の受精卵レベ

ルでの検討

本実施例では、スフィンゴ脂質合成機能を個体全体、即ち受精卵のレベルから欠失する場合、どのような影響があるかを調べた。具体的には図6に示した戦略に従った。

【0163】Creタンパク質を個体全体で発現するCAG-Creトランスジェニックマウスは、大阪大学医学部 宮崎純一教授より入手した。これより、先ず以下の交配によりLcb2遺伝子をヘテロに欠失し、また、Cre遺伝子もヘテロに有するノックアウトマウスを得た。

【0164】具体的には、実施例5で得られた変異Lcb2遺伝子を持つマウス(雌)(ホモ接合体)とヘテロ接合CAG-Creトランスジェニックマウス(雄)とを交配した。それらの子供について尻尾の一部を採取し、ゲノムDNAを抽出した。Lcb2遺伝子の確認には実施例4で述べたSacI切断による5'プローブを用いたサザンブロッティングを、CAG-Cre遺伝子の確認には実施例6で述べたBamHI切断によるCreプローブを用いたサザンブロッティングを行った。なお、Lcb2遺伝子の確認では野生型(「+」)の場合は8.5kbが、欠失型(「-」)の場合は7.5kbのバンドが認められ、CAG-Cre遺伝子の確認においては、3.0と1.5kbのバンドが認められる。その結果、一組の交配から16匹の子(雄:8匹、雌:8匹)が得られ、このうち雄2匹、雌3匹が遺伝型が「+/-, CAG-Cre/0」であった。

【0165】上記「+/-, CAG-Cre/0」ノックアウトマウスを、実施例5で作製したNeo遺伝子を含んだ変異Lcb2遺伝子「Lcb2target」の「ホモ」接合体と交配し、それから得られた子孫の遺伝子型を調べた。その結果を図6に示した。図6において、「target」は変異Lcb2遺伝子「Lcb2target」を有すること、「+」は野生型のLcb2遺伝子を有すること、「-」はLcb2遺伝子が欠失していること、「Cre」はCre遺伝子が存在することを意味する。図6に示されるように、(+/-target, 0/0)が28個体、(-/-target, 0/0)が34個体、(+/-, Cre/0)が20個体得られた。しかしながら、メンデルの法則に従えば上記3種と同程度で得られるはずの(-/-, Cre/0)の遺伝子型を有する個体は一つも得られなかった。

【0166】よって、スフィンゴ脂質合成機能を個体全体、即ち受精卵のレベルから欠失する場合、初期発生を乗り越えられないことが示された。

実施例8 K5-Creトランスジェニックマウスを用いたスフィンゴ脂質合成の表皮特異的欠損の検討

本実施例では、スフィンゴ脂質合成機能を表皮特異的に欠失する場合、どのような影響があるかを調べた。コンディショナルノックアウトマウスの作製は、実施例7と

10

20

30

40

50

同様に行った。但し、CAG-Creトランスジェニックマウスの代わりに、Creタンパク質を表皮特異的に発現するK5-Creトランスジェニックマウスを用いた。K5-Creトランスジェニックマウスは、本発明者の大阪大学医学部 竹田潤二より入手可能である。また、実施例5で作製したNeo遺伝子を含んだ変異Lcb2遺伝子「Lcb2target」の「ホモ」接合体を用いた。

【0167】得られた本発明のノックアウトマウスの生後12時間の写真を図7に示す。図7に示されるように、本発明のコンディショナルノックアウトマウスは、対照の野生型マウスと比較して表皮に湿潤感がなく、全体にザラザラした状態であった。

【0168】図8に、得られた本発明のノックアウトマウスの3週齢の写真を示す。図8よりもわかるように、野生型の対照と比較して全体に体毛が薄く、特に耳の後ろは毛が薄くはれていた。また、髪の毛の生え変わるサイクルも、一般に野生型よりも遅く、体毛がほとんど生えないものも存在した。

【0169】図9に、3週齢の本発明のノックアウトマウスと野生型の対照の表皮切片断面の顕微鏡写真（倍率100）を示す。図9に示すように、本発明のノックアウトマウスは濾胞を形成していた。さらに、図9において黒い点のように見えるものはリンパ球であり、これが数多く存在することより、炎症を起こしている可能性が考えられる。

【0170】本実施例のスフィンゴ脂質合成機能を表皮特異的に欠失したノックアウトマウスは、4週齢までに全て死亡してしまった。

実施例9 Lck-Creトランスジェニックマウスを用いたスフィンゴ脂質合成のT細胞特異的欠損の検討
本実施例では、スフィンゴ脂質合成機能をT細胞特異的に欠失する場合、どのような影響があるかを調べた。コンディショナルノックアウトマウスの作製は、実施例7と同様に行った。但し、CAG-Creトランスジェニックマウスの代わりに、Creタンパク質をT細胞特異的に発現するLck-Creトランスジェニックマウスを用いた。Lck-Creトランスジェニックマウスは、本発明者の大阪大学医学部 竹田潤二より入手可能である。また、実施例5で作製したNeo遺伝子を含んだ変異Lcb2遺伝子「Lcb2target」の「ホモ」接合体を用いた。

【0171】得られた本発明のノックアウトマウスについてT細胞への影響を調べた。手法は、例えば松崎有未他著（1999）、フローサイトメトリー自由自在、中

内啓光監修（秀潤社）pp3-13にて詳細に解説されている。具体的には6週令の雄ノックアウトマウスより胸腺および脾臓を摘出し、それぞれPE標識抗CD4抗体及びAPC標識抗CD8抗体にて染色を施した。次いで、FACS Vantage（Becton, Dickinson and Company社製）を用いて、CD4およびCD8に関する2次元解析による細胞選別を行った。蛍光色素PE、APCに関してはそれぞれ検出器FL2（励起/検出波長、488nm/575nm）とFL4（598nm/660nm）にて検出、その強度と細胞数に関して数値化した。対照として野生型マウスについても同様に細胞選別を行った。

【0172】結果を図10に示す。図10においてCD4のみ陽性の細胞はヘルパーT細胞、CD8のみ陽性の細胞はキラーT細胞に相当する。T細胞は未分化の状態では、CD4およびCD8双方とも陰性、次いで、双方とも陽性になり、さらに分化が進むとCD4のみ陽性（ヘルパーT細胞）、またはCD8のみ陽性（キラーT細胞）となる。図10において胸腺では本発明のノックアウトマウスは野生型と比較して特に、CD8のみ陽性（キラーT細胞）が4.6%から2.3%と顕著に減少した。脾臓ではさらに顕著な影響が観察され、胸腺と同様にCD8のみ陽性（キラーT細胞）が12.4%から3.0%と1/4以下に減少した。

【0173】さらに、キラー細胞まで分化したT細胞について、その成熟度を調べた。具体的には、図10に示した胸腺由来のT細胞でCD8のみ陽性を示した細胞（キラーT細胞）（全体の2.3%）について、抗CD3e抗体 145-2C11（Pharmingen社より入手可能）を用いて、細胞表面のCD3e発現量を調べた。細胞表面のCD3e発現量は、T細胞が教育を受けると観察され、成熟度の目安となる。結果を図11に示す。図11は、本発明のノックアウトマウスの胸腺由来のキラーT細胞には、細胞表面のCD3e発現量が野生型の場合と比較して少ない細胞、即ち成熟度の低い細胞が存在すること（キラーT細胞の43%程度）を示している。

【0174】よって、本実施例のスフィンゴ脂質合成機能をT細胞特異的に欠失させたノックアウトマウスは、T細胞の分化、特にキラーT細胞への分化が減少し、さらに、キラーT細胞へ分化した細胞のうちでも、その成熟度が低いものが成熟度の低いものが存在することが示された。

【0175】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The Institute of Physical and Chemical Research

<120> Conditionally knocked-out mammals of sphingolipids synthesis

<130> 003248

<160> 7

45

46

<210> 1

<211> 560

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met	Arg	Pro	Glu	Pro	Gly	Gly	Cys	Cys	Cys	Arg	Arg	Pro	Met	Arg	Ala
1				5					10				15		
Asn	Gly	Cys	Val	Lys	Asn	Gly	Glu	Val	Arg	Asn	Gly	Tyr	Leu	Arg	Ser
			20					25					30		
Ser	Thr	Ala	Thr	Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Gln	Ile	His	His	Val	Thr	Glu
		35					40					45			
Asn	Gly	Gly	Leu	Tyr	Lys	Arg	Pro	Phe	Asn	Glu	Ala	Phe	Glu	Glu	Thr
	50				55					60					
Pro	Met	Leu	Val	Ala	Val	Leu	Thr	Tyr	Val	Gly	Tyr	Gly	Val	Leu	Thr
65					70				75					80	
Leu	Phe	Gly	Tyr	Leu	Arg	Asp	Phe	Leu	Arg	His	Trp	Arg	Ile	Glu	Lys
				85					90					95	
Cys	His	His	Ala	Thr	Glu	Arg	Glu	Glu	Gln	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Leu
			100					105					110		
Tyr	Gln	Asp	Phe	Glu	Asn	Phe	Tyr	Thr	Arg	Asn	Leu	Tyr	Met	Arg	Ile
	115					120					125				
Arg	Asp	Asn	Trp	Asn	Arg	Pro	Ile	Cys	Ser	Val	Pro	Gly	Ala	Lys	Val
	130				135					140					
Asp	Ile	Met	Glu	Arg	Lys	Ser	His	Asp	Tyr	Asn	Trp	Ser	Phe	Lys	Tyr
145					150					155				160	
Thr	Gly	Asn	Ile	Ile	Lys	Gly	Val	Ile	Asn	Met	Gly	Ser	Tyr	Asn	Tyr
			165					170					175		
Leu	Gly	Phe	Ala	Arg	Asn	Thr	Gly	Ser	Cys	Gln	Glu	Ala	Ala	Ala	Glu
		180				185					190				
Val	Leu	Lys	Glu	Tyr	Gly	Ala	Gly	Val	Cys	Ser	Thr	Arg	Gln	Glu	Ile
	195					200					205				
Gly	Asn	Leu	Asp	Lys	His	Glu	Glu	Leu	Glu	Lys	Leu	Val	Ala	Arg	Phe
	210				215					220					
Leu	Gly	Val	Glu	Ala	Ala	Met	Thr	Tyr	Gly	Met	Gly	Phe	Ala	Thr	Asn
225				230					235					240	
Ser	Met	Asn	Ile	Pro	Ala	Leu	Val	Gly	Lys	Gly	Cys	Leu	Ile	Leu	Ser
		245				250					255				
Asp	Glu	Leu	Asn	His	Ala	Ser	Leu	Val	Leu	Gly	Ala	Arg	Leu	Ser	Gly
	260				265					270					
Ala	Thr	Ile	Arg	Ile	Phe	Lys	His	Asn	Asn	Met	Gln	Ser	Leu	Glu	Lys
	275				280					285					
Leu	Leu	Lys	Asp	Ala	Ile	Val	Tyr	Gly	Gln	Pro	Arg	Thr	Arg	Arg	Pro
	290				295					300					
Trp	Lys	Lys	Ile	Leu	Ile	Leu	Val	Glu	Gly	Ile	Tyr	Ser	Met	Glu	Gly
305			310					315						320	
Ser	Ile	Val	Arg	Leu	Pro	Glu	Val	Ile	Ala	Leu	Lys	Lys	Lys	Tyr	Lys
		325				330				335					
Ala	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Asp	Glu	Ala	His	Ser	Ile	Gly	Ala	Leu	Gly	Pro
	340					345				350					
Ser	Gly	Arg	Gly	Val	Val	Asp	Tyr	Phe	Gly	Leu	Asp	Pro	Glu	Asp	Val

47

48

355 360 365
 Asp Val Met Met Gly Thr Phe Thr Lys Ser Phe Gly Ala Ser Gly Gly
 370 375 380
 Tyr Ile Gly Gly Lys Lys Glu Leu Ile Asp Tyr Leu Arg Thr His Ser
 385 390 395 400
 His Ser Ala Val Tyr Ala Thr Ser Met Ser Pro Pro Val Met Glu Gln
 405 410 415
 Ile Ile Thr Ser Met Lys Cys Ile Met Gly Gln Asp Gly Thr Ser Leu
 420 425 430
 Gly Lys Glu Cys Ile Gln Gln Leu Ala Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Arg
 435 440 445
 Arg Arg Leu Lys Glu Met Gly Phe Ile Ile Tyr Gly Asn Glu Asp Ser
 450 455 460
 Pro Val Val Pro Leu Met Leu Tyr Met Pro Ala Lys Ile Gly Ala Phe
 465 470 475 480
 Gly Arg Glu Met Leu Lys Arg Asn Ile Gly Val Val Val Val Gly Phe
 485 490 495
 Pro Ala Thr Pro Ile Ile Glu Ser Arg Ala Arg Phe Cys Leu Ser Ala
 500 505 510
 Ala His Thr Lys Glu Ile Leu Asp Thr Ala Leu Lys Glu Ile Asp Glu
 515 520 525
 Val Gly Asp Leu Leu Gln Leu Lys Tyr Ser Arg His Arg Leu Val Pro
 530 535 540
 Leu Leu Asp Arg Pro Phe Asp Glu Thr Thr Tyr Glu Glu Thr Glu Asp
 545 550 555 560

<210> 2

<211> 1893

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 2

gtccctgctgc cgggtgctgc cgggaggatg cggccggagc ccggaggctg ctgctgccgc 60
 cgcccgatgc gggcgaacgg ctgcgtcaag aacggggaag tgaggaacgg gtacttgagg 120
 agcagcaccg ccaccgtcgc ggctgccggc cagattcatc atgtaacaga aaatggagga 180
 ctgtacaaaa gaccgttcaa tgaagctttt gaagaaacac ccatgctggg tgctgtgctc 240
 acatatgtgg gctatggcgt actcaccttc tttggatata ttcgagattt cttgaggcat 300
 tggagaattg aaaagtgcc ccatgcaaca gaaagagaag aacaaaagga ctttgtgtcc 360
 ttgtatcagg attttgaaaa ctctatatac aggaacctct acatgagaat cagagacaac 420
 tggaatcggc ctatctgtag tgtgcctgga gccaaagggtg atatcatgga gagaaaatct 480
 catgactata actggtcatt caagtacaca gggaatataa ttaaagggtg aataaacatg 540
 ggttcctaca actatcttgg atttgcgagg aacactggat catgtcagga agcagctgct 600
 gaagtctca aggagtatgg agcaggggtg tgcagcactc gtcaggaaat tggaaacctg 660
 gacaagcatg aagaactaga gaaattggtg gcaaggttct taggtgtgga agctgctatg 720
 acctatggca tgggatttgc acaaaattca atgaacattc ctgctcttgt tggcaaaggt 780
 tgctgtatgc tgagtatga gctgaaccat gcgtcactgg ttctaggagc cagactgtca 840
 ggagcaacca ttcgaatctt caaacacaac aatatgcaaa gcttagagaa gcttttaaaa 900
 gatgccattg tttatggtca gcctcggaca agaagacctt ggaagaaaat cttaatcctt 960
 gtggaaggca tatatagtat ggaggggtct attgttcgcc ttcctgaagt gattgtcttc 1020
 aagaagaaat acaaggcata cttgtatctg gatgaggctc acagcattgg ggctcttggc 1080
 ccttcagggc gaggcgtggg agattacttt ggcctggatc ctgaggatgt agatgttatg 1140
 atgggaacat tcacaaagag cttcgggtgct tcaggaggat acatcggagg caagaaggag 1200

49

50

ctgatagact acctgcgcac acattctcac agtgctgtgt atgccacgtc gatgtcaccg 1260
 cctgtgatgg aacagattat cacctccatg aagtgcacatc tggggcagga tggcaccagt 1320
 cttggcaaag aatgtataca gcagttggct gagaacacca ggtatttcag gagacgcctg 1380
 aaggaaatgg ggttcatcat ctatggcaat gaagactccc cggtgggtgcc tttgatgctc 1440
 tacatgccgg ccaaatttgg cgcctttgga agagagatgc tgaagcggaa cattgggtga 1500
 gttgtgggtg gatttctctc taccctgatc attgagtcca gagccagatt ttgcctgtca 1560
 gcagtcata ccaaagaaat acttgacact gctttgaagg agatagatga agttggggat 1620
 ctgctgcagc taaagtactc tcgccaccgg ctggtgcctc tactggacag gccctttgat 1680
 gagactacct atgaagagac agaagactga gcctttcttg tgctccctag agggggataa 1740
 ttctctccag gacagtgtgt ggcctttctg agccaattcc aggaaccaca cttcagtac 1800
 cacttcatgt gaaagacatt tctgaagcta ctgaagggtg ccaccttcac tccaaatggc 1860
 attttataaa tagtaaaaaa accaaactgc ttc 1893

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Bacteriophage P1

<220>

<223> LoxP site

<400> 3

ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttat

<210> 4

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed cDNA for producing the plasmid pBS-Lcb2B(2)loxP

<400> 4

ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttataagctt gca

<210> 5

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed cDNA for producing the plasmid pBS-Lcb2B(2)loxP

<400> 5

agcttataac ttcgtatagc atacattata cgaagttatt gca

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed cDNA for PCR

<400> 6

gtgctgctag gggttccatt tcagccacat

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed cDNA for PCR

<400> 7

tagtgagacg tgctacttcc atttgtcacg

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、スフィンゴ脂質の生合成経路を示す。

【図2】図2は、リコンビネースタンパク質／リコンビネース標的配列システムを利用したコンディショナルノックアウトの例の概念を示す。

【図3】図3は、Lcb2-AおよびLcb2-Bの制限酵素地図を示す。

【図4】図4は、本発明のターゲティングベクターを作製10の戦略を示す。

【図5】図5は、本発明のコンディショナルノックアウトマウスの作製戦略の流れ図である。

【図6】図6は、CAG-Creトランスジェニックマウスを用いたスフィンゴ脂質生合成の受精卵レベルでの検討の戦略と結果を示す。

【図7】図7は、K5-Creトランスジェニックマウスを用いたスフィンゴ脂質生合成の表皮特異的欠損ノッ

クアウトマウスの生後12時間の写真を示す。

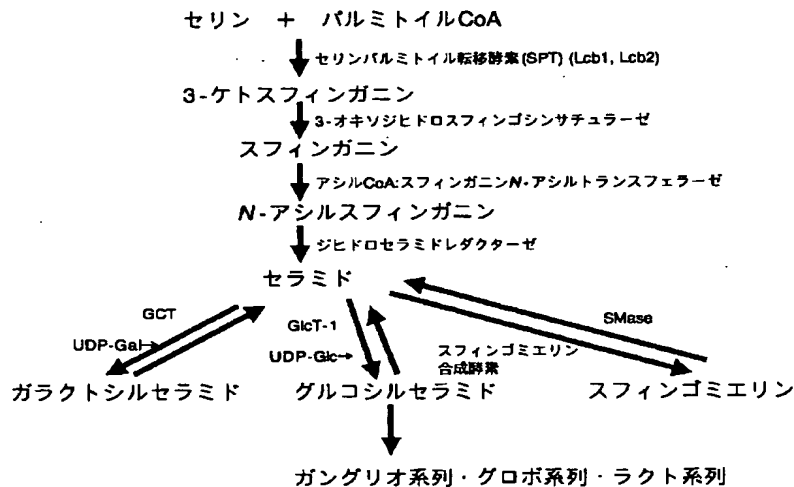
【図8】図8は、K5-Creトランスジェニックマウスを用いたスフィンゴ脂質生合成の表皮特異的欠損ノックアウトマウスの3週齢の写真を示す

【図9】図9は、K5-Creトランスジェニックマウスを用いたスフィンゴ脂質生合成の表皮特異的欠損ノックアウトマウスの3週齢の表皮切片断面の顕微鏡写真を示す。

【図10】図11は、Lck-Creトランスジェニックマウスを用いたスフィンゴ脂質生合成のT細胞特異的欠損ノックアウトマウスの、CD4およびCD8を示標にしたT細胞の細胞選別の結果を示す。

【図11】図11は、Lck-Creトランスジェニックマウスを用いたスフィンゴ脂質生合成のT細胞特異的欠損ノックアウトマウスのキラーT細胞における細胞表面のCD3e発現量を調べた結果を示す。

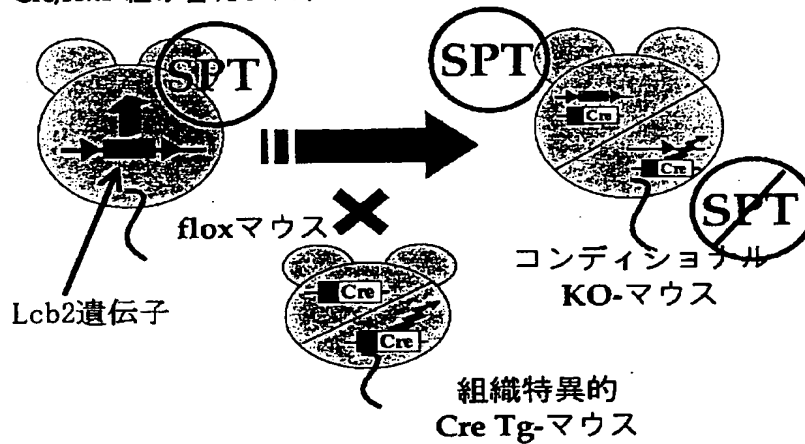
【図1】

図1：スフィンゴ脂質の生合成

【図2】

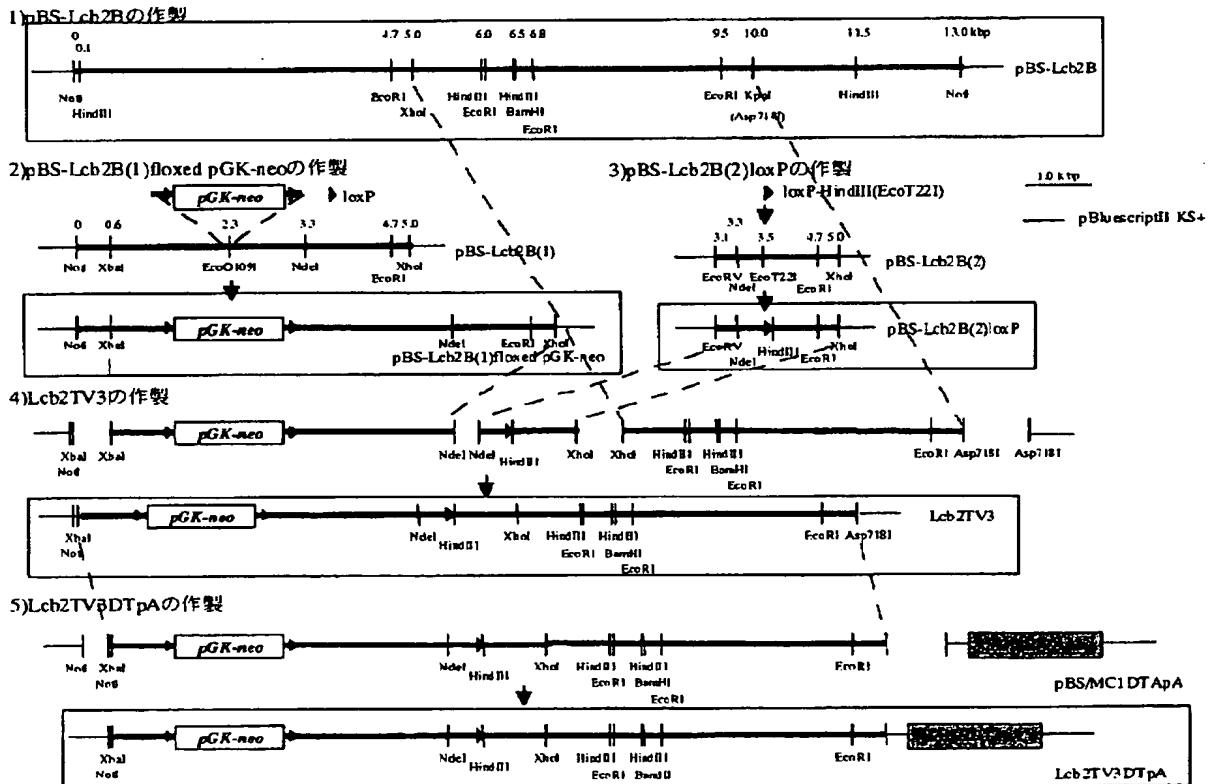
図2：コンディショナルノックアウト・システム<工程>

Cre/loxP 組み替えシステム

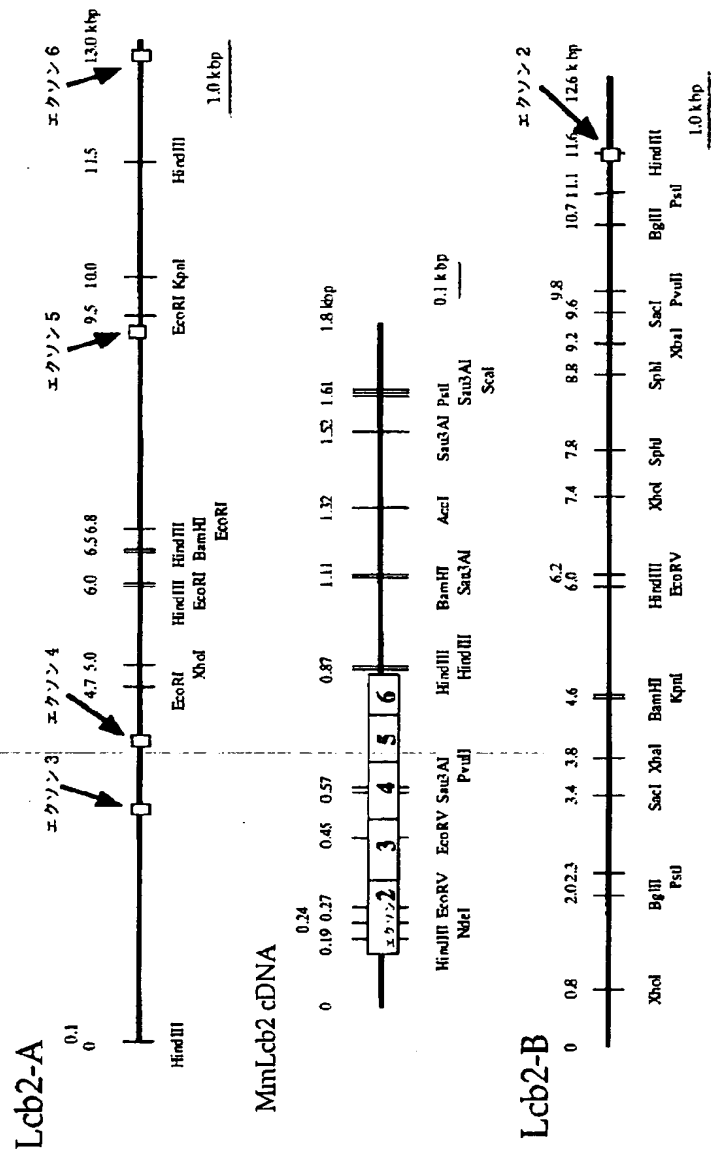


【図4】

図4：ターゲティングベクターの作製戦略

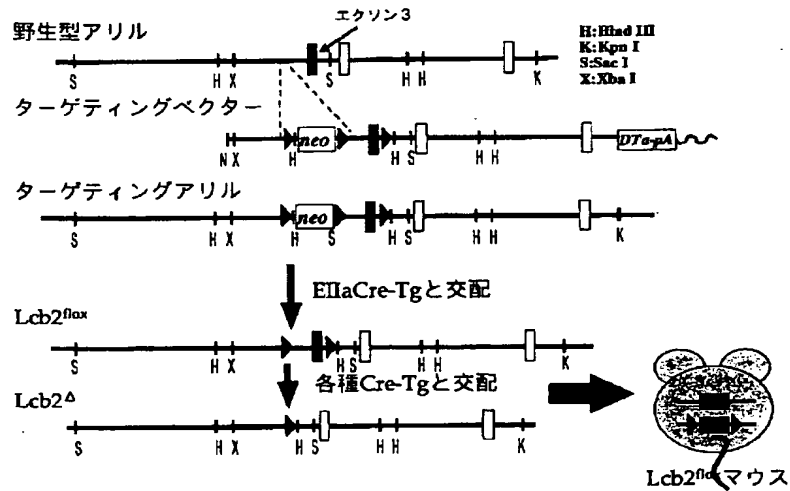


【図 3】



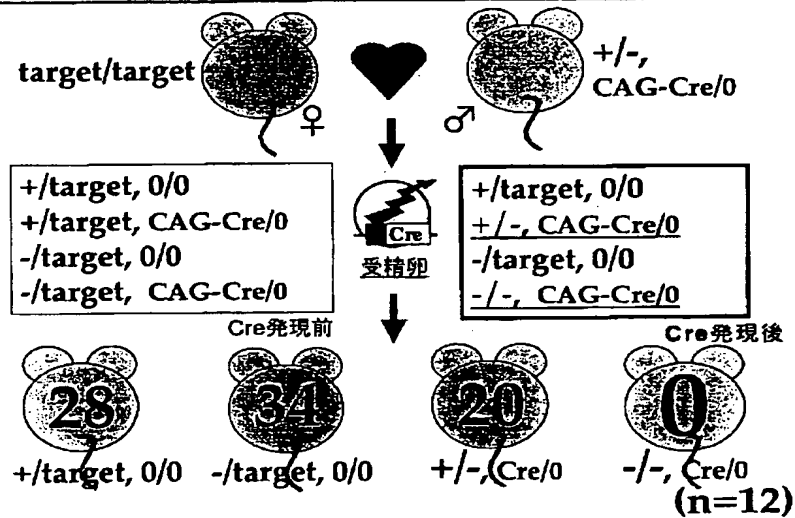
【図5】

図5：コンディショナルノックアウトマウスの作製戦略

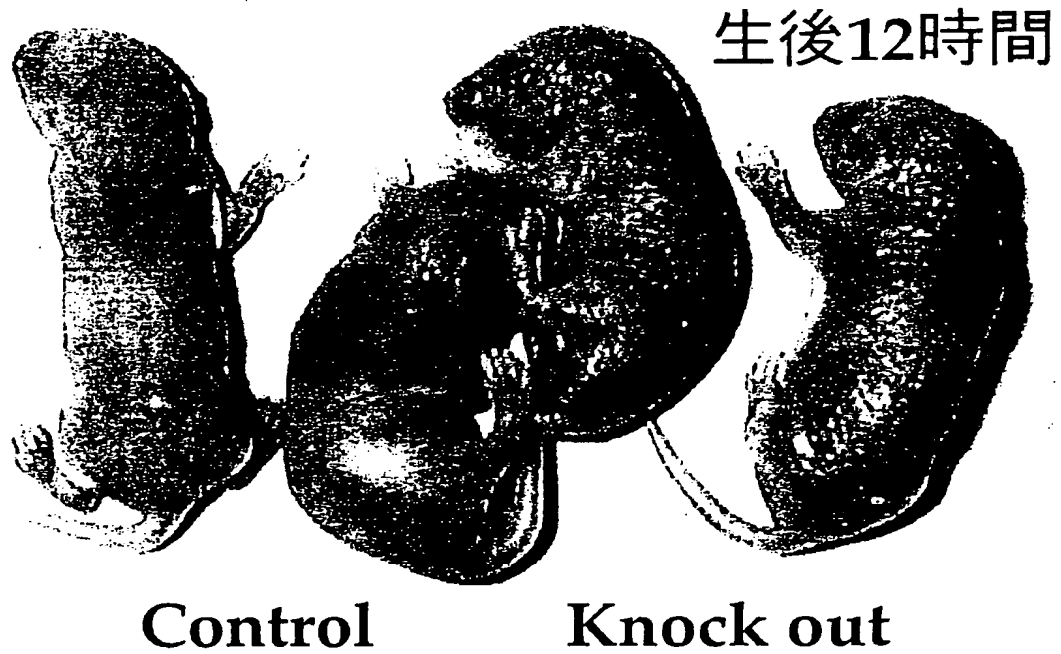


【図6】

図6：CAG-CreTgを用いた受精卵からの欠損



【図7】

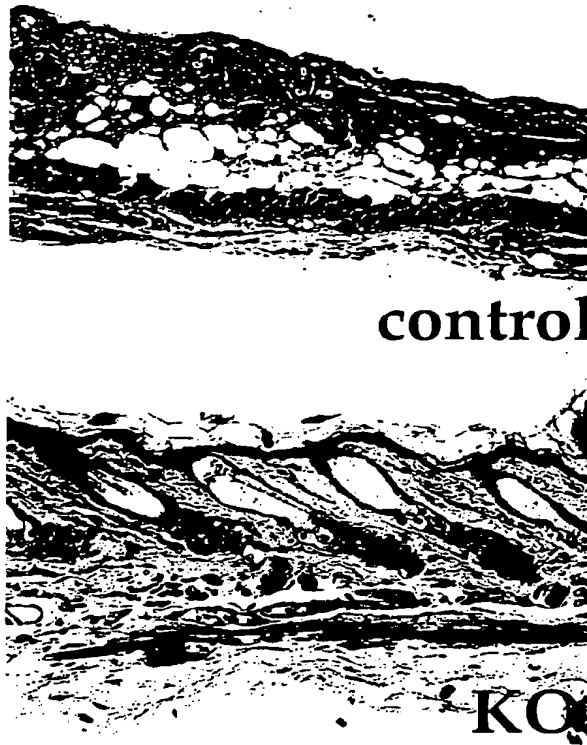
図7：K5-CreTgを用いた表皮特異的欠損（1）

【図8】

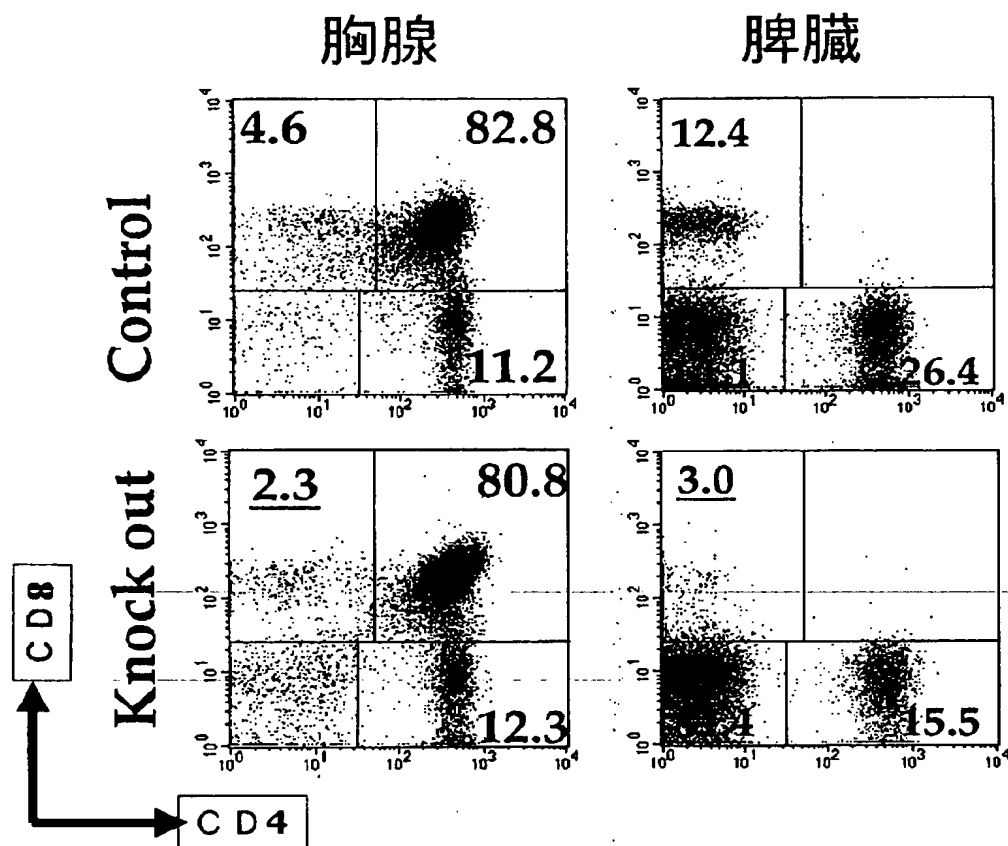
図8 : K5-CreTgを用いた表皮特異的欠損 (2)

【図9】

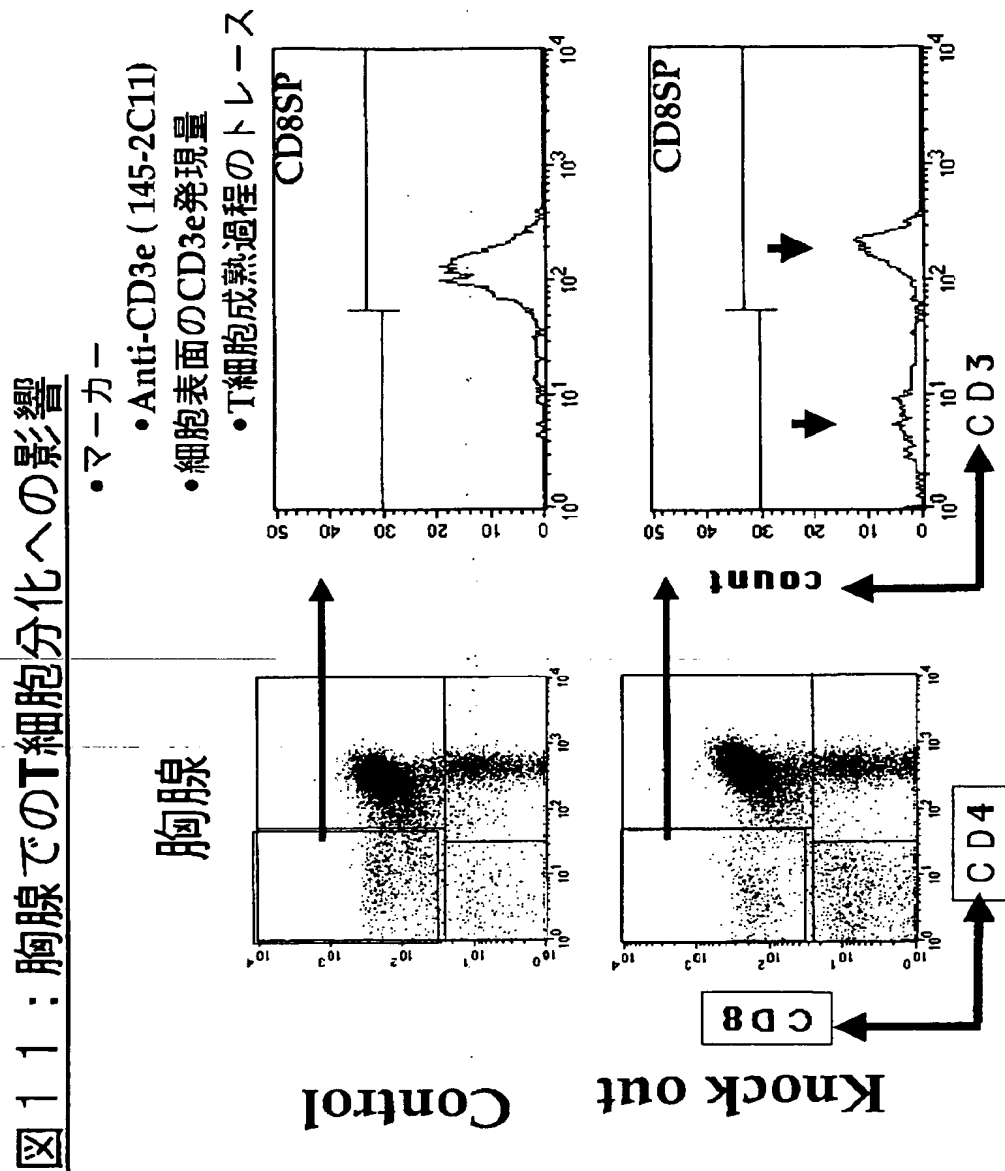
図9 : K5-CreTgを用いた表皮特異的欠損 (3)



【図10】

図 10 : T細胞分化への影響

【図11】



フロントページの続き

(72)発明者 竹田 潤二

大阪府吹田市山田西3-38-9

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA10 BA80 CA01
CA02 CA09 CA20 DA02 EA04
FA02 GA14 GA18 GA27 HA08
HA20